

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Jijel

جامعة جيجل

Faculté des Sciences de La Nature et

de La vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie

Moléculaire et Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2738

*Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme
Des Etudes Supérieures en Biologie*

Option : Biochimie

Intitulé

**CIBLES BIOCHIMIQUES ET BIOMARQUEURS
D'EXPOSITION AU BENZO(A)PYRÈNE**

Membres de Jury:

Président: M^{me} CHERBAL Asma

Encadreur: M^{me} KEBSA Wided

Présenté par :

BOUSSALEM Ilham

KARA Salima

ROUIMEL Siham

Année Universitaire: 2012-2013

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu, le tout puissant et maître de l'univers qui nous a donné la capacité nécessaire, la forte volonté et la patience afin d'accomplir ce travail, et qui nous a toujours guidé vers le bon chemin.

Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin pour réaliser ce travail, en particulier notre encadreur Madame KEBSA Wided qui nous a proposé ce sujet de recherche et qui nous a encadré par ses conseils et ses efforts durant la préparation de ce mémoire.

Nous remercions aussi M^{me} CHERBAL Asma d'avoir accepté de juger le contenu du présent mémoire. Nos plus vifs remerciements et tout notre reconnaissance vont à tous les enseignants du département de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'université de Jijel.

Nous ne serions jamais là sans l'aide et le soutien de nos familles.

Merci à tous et à toutes.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. Métabolisme du B(a)p et cancérogènes.....	2
1. Généralités sur le B(a)p.....	3
1.1. Définition et propriétés physicochimiques.....	3
1.2. B(a)p dans l'environnement général et professionnel.....	3
1.3. Propriétés toxicologiques.....	4
1.3.1. Toxicités aiguë et chronique.....	4
1.3.2. Effets du B(a)p sur la santé.....	5
2. Absorption et distribution.....	5
2.1. Absorption.....	5
2.2. Distribution.....	6
3. Activation métabolique et élimination du B(a)p.....	6
3.1. Les voies d'activation métabolique du B(a)p.....	7
3.1.1. La voie de mono-oxygénation par les cyt P450.....	8
3.1.2. La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases.....	9
3.1.3. La voie de formation des quinones du B(a)p par les aldo-kéto réductases.....	10
3.2. L'élimination des métabolites du B(a)p par conjugaison.....	11
3.2.1. Conjugaison par les UDP-Glucuronosyl-transférases.....	11
3.2.2. Conjugaison par les glutathion-S-transférases.....	12
3.2.3. Conjugaison par les Sulfo-transférases.....	12
4. Cancérogenèse pulmonaire du B(a)p.....	13
CHAPITRE II. Cibles biochimiques du B(a)p.....	14
1. Induction des enzymes du métabolisme.....	15
2. Formation des adduits d'ADN.....	16
2.1. Les adduits de la voie du BPDE.....	18
2.2. Les adduits du radical cation du B(a)p.....	19
2.3. La génotoxicité de la voie des quinones du B(a)p.....	19
3. Induction du stress oxydant par le B(a)p.....	20
4. Dommages oxydatifs des biomolécules par le B(a)p.....	22
4.1. Dommages oxydatifs de l'ADN nucléaire et mitochondrial.....	22
4.1.1. Oxydation des bases de l'ADN.....	22
4.1.1.1. Oxydation des bases puriques de l'ADN (Guanine et Adénine).....	22
4.1.1.2. Oxydation des bases pyrimidiques de l'ADN (Thymine et Cytosine).....	23
4.1.2. Cassures de brins de l'ADN.....	23

4.2. Dommages oxydatifs des lipides par le B(a)p: Peroxydation lipidique.....	24
4.3. Action sur les systèmes de défenses anti-oxydantes.....	24
4.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	25
4.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	26
5. Conséquences biologiques des lésions de l'ADN.....	27
5.1. Réparation des lésions.....	27
5.1.1. Réparation par excision de nucléotides (REN).....	27
5.1.2. Réparation par excision de bases (REB).....	27
5.1.3. La réparation des cassures de l'ADN.....	28
5.2. Réplication des lésions et survenue de mutations.....	28
5.3. Les arrêts de cycle cellulaire.....	30
5.4. La mort cellulaire par apoptose.....	30
5.4.1. B(a)p et protéines anti- et pro- apoptotiques.....	31
5.4.2. Caractéristiques membranaires et apoptose chimio-induite.....	31
5.4.3. Implication de la fluidité membranaire.....	32
5.4.4. Implication des lysosomes.....	32
CHAPITRE III. Biomarqueurs d'exposition au B(a)p.....	34
1. Notion de biomarqueurs.....	35
2. Biomarqueurs de dose interne des B(a)p.....	36
3. Biomarqueurs de dose efficace.....	38
4. Biomarqueurs d'effets biologiques précoces.....	41
4.1. Les lésions oxydatives.....	41
4.2. Les effets cytogénétiques et les mutations.....	42
5. Biomarqueurs de susceptibilité.....	43
CONCLUSION.....	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Structure moléculaire du benzo(a)pyrène	3
FIGURE 2. Voies d'activation métabolique du B(a)p.....	7
FIGURE3. Voie du CYP 450.....	8
FIGURE4. Isomères du Benzo(a)pyrène 7, 8 - dihydrodiol -9, 10- époxide.....	9
FIGURE5. Formation du radical cation.....	10
FIGURE6. Voies des quinones.....	11
FIGURE 7. Voies de conjugaison des métabolites du B(a)P avec l'exemple du 3-OHB(a)p et du BPDE. A : glucurono-conjugaison, B : sulfo-conjugaison, C : conjugaison au glutathio.....	12
FIGURE 8. Schéma d'activation métabolique du B(a)p chez les vertébrés supérieurs proposé à partir d'une synthèse de la littérature.....	13
FIGURE 9. Mécanisme d'induction du cytochrome P450	16
FIGURE 10. Configuration d'un brin d'ADN.....	17
FIGURE 11. Représentation de la dépurination d'un adduit formé en N7 de la Gua par un électrophile R+..	17
FIGURE 12. Principaux adduits du BPDE.....	18
FIGURE 13. Principaux adduits de l'ADN du radical cation du B(a)p.....	19
FIGURE 14. Activation métabolique de BPD par les AKRs et formation d'ERO (Park et al., 2008).....	22
FIGURE 15. Les systèmes de réparation : NER et BER.....	28
FIGURE 16. Mécanismes impliqués dans la réparation de la 8-oxodGuo par les enzymes MutM et MutY pour prévenir l'apparition d'une mutation.....	30
FIGURE 17. Schéma récapitulatif de l'implication des compartiments intracellulaires dans l'apoptose induite par le B(a)p dans les cellules F258.....	33
FIGURE 18. Les différents niveaux de biomarqueurs.....	36

LISTE DES ABREVIATION

3-OHB(a)p	3-hydroxybenzo(a)pyrène
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
8-oxoGua	8-oxo-7,8-dihydroguanine
8-oxoGuo	8-oxo-7,8-dihydroguanosine
Ade	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AhR	Arylhydrocarbures
AKR	Aldo-kéto réductase(s)
ARN	Acide ribonucléique
ARNT	Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocatore
ATP	Adénosine triphosphate
B(a)p	Benzo(a)pyrene
BPD	(-) –trans-Benzo(a)pyréne -7,8 –dihydrodiol
BPDE	7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène
BPQ	B(a)p-7,8-dione
CAT	Catalase
Cyt	Cytosine
Cyt.	Cytochrome(s)
dAdo	2'-désoxyadénosine
dCyd	2'-désoxycytidine
DD	dihydrodiol déhydrogénases
dGuo	2'-désoxyguanosine
DL50	Dose létale 50
EH	époxyde hydrolase
ERO	Espèce(s) réactive(s) de l'oxygène
GGR	Global Genome Repair
GST	glutathion synthétyl-transférase(s)
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HDL	High density lipoprotéine
LDL	Low density lipoprotéine
MDA	Malondialdehyde
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
O₂^{•-}	Anion super oxyde
OGG1	La 8-oxodGuo glycosylase 1
RCT	Réparation couplée à la transcription
REB	Réparation par excision de base
REN	Réparation par excision de nucléotides
RPA	protéine de réplication A
Site AP	Site apurinique, apyrimidique
SOD	Superoxyde dismutase
TCR	Transcription Coupled Repair
Thy	Thymine
UGT	Les UDP-Glucuronosyltransférases

Introduction

Le benzo(a)pyrène (B(a)p) est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), il est le premier à avoir été reconnu pour présenter une activité cancérigène et à être impliqué dans le cancer du poumon chez l'homme. Il est considéré comme le polluant de l'environnement le plus étudié, qui existe dans tous les compartiments: eau, air, sol et dans certains produits alimentaires. L'homme est exposé au B(a)p par l'ingestion des aliments contaminés, inhalation d'air pollué ou par contact directe avec la peau. Le benzo(a)pyrène est présent dans les combustibles fossiles. Il est également formé lors des combustions incomplètes puis rejeté dans l'atmosphère. Les sources naturelles d'émission sont les éruptions volcaniques et les feux de forêts. Le benzo(a)pyrène est également synthétisé par des plantes, des bactéries et des algues. Sa présence dans l'environnement est d'autre part d'origine anthropique : raffinage du pétrole, du schiste, utilisation du goudron, du charbon, sources d'énergie et de chaleur, revêtements routiers, fumée de cigarette, échappement des machines... etc.

La métabolisation du B(a)p passe par trois voies principales dont la plus importante est celle de cytochrome P450 qui conduit à la formation du Benzo(a)pyrène-7,8-di hydro diol-9,10-époxyde (BPDE), qui est le métabolite le plus toxique du B(a)p en raison de sa capacité à induire la cancérogénèse à travers des mutations médiées par la formation d'adduits avec l'ADN, il est aussi capable de générer un stress oxydatif cellulaire qui à son tour peut provoquer ou exacerber des lésions mutagènes menant à la transformation maligne des cellules. En raison de sa cancérogénicité, il apparaît primordial de mesurer l'exposition des individus au B(a)p afin d'identifier les groupes à risque bien avant la survenue d'une pathologie. La mesure de l'exposition est classiquement réalisée par la mesure de dose externe par des prélèvements atmosphériques. Toutefois, ce type de mesure ne prend pas en compte divers éléments comme les différentes voies d'absorption, et les facteurs individuels de métabolisation ou encore de réparation de l'ADN. La mesure de dose externe n'est donc pas représentative de la dose de polluant qui a réellement pénétré dans l'individu ni de la dose potentiellement à risque quant à la survenue d'un cancer. Il est donc important de développer des outils de surveillance biologique de l'exposition afin de pallier ces manques; on parle alors de biomarqueurs.

Notre recherche bibliographique a pour but de mettre en évidence les cibles biochimiques et les biomarqueurs d'exposition aux benzo(a)pyrène en passant par sa métabolisation, ses voies de bioactivation et son devenir dans l'organisme.

CHAPITRE I.

Métabolisme du B(a)p et cancérogènes

1. Généralités sur le B(a)p

1.1. Définition et propriétés physicochimiques

Le benzo(a)pyrène (B(a)p) est un HAP à cinq cycles aromatiques. Sa formule brute est $C_{20}H_{12}$ présent dans l'atmosphère sous forme particulaire. Il est constitué de deux régions qui sont des sites de réactions chimiques (figure 1). La région k est la région comprise entre le quatrième et cinquième carbone. Cette région est une zone de grande densité électronique et de haute activité métabolique. La région baie est la région comprise entre le neuvième et le douzième carbone. Elle est considérée comme étant très réactive. B(a)p biotransformé selon des voies multiples pouvant aboutir pour la plupart à des intermédiaires époxydes impliqués dans leur génotoxicité (Miller *et al.*, 2001).

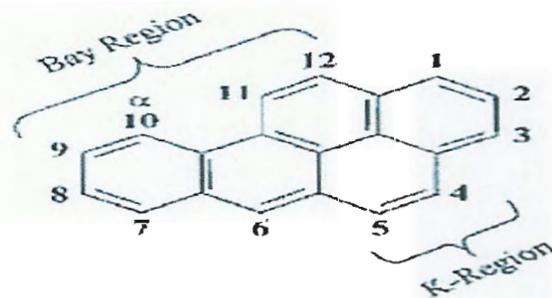


Figure 1. Structure moléculaire du benzo(a)pyrène (Miller *et al.*, 2001)

Le B(a)p, composé chimique solide, a un poids moléculaire de 252.32 g/mol, une solubilité égale à 6 et a un point de fusion de 179°C, il est soluble dans les hydrocarbures aromatiques, cependant sa solubilité dans l'eau est faible (0,2 à 6,1 mg/L). A température ambiante ordinaire, le B(a)p se présente sous forme de cristaux jaunes inodores; il est stable jusqu'à des températures très élevées. En solution, il s'oxyde sous l'influence de la lumière, de l'air et de la chaleur (Turner et Rawling, 2002).

1.2. B(a)p dans l'environnement général et professionnel

Comme beaucoup des HAP, le B(a)p a principalement deux origines, l'une environnementale, l'autre technologique. Il est présent dans les combustibles fossiles tels que le charbon ou le pétrole. Il est également formé lors de la combustion incomplète des matières organiques. Outre cette origine naturelle, sa présence dans l'environnement est également d'origine anthropique: raffinage du pétrole, du schiste, utilisation du goudron, du charbon, du coke, des carburants, sources d'énergie et de chaleur, revêtements routiers, gaz d'échappement, huiles moteur. Il y'a des sources naturelles d'émission des HAP qui sont essentiellement dues aux éruptions volcaniques et aux feux de forêts. Le B(a)p est également synthétisé par des plantes, des bactéries et des algues (Bisson *et al.*, 2006).

Certaines technologies alimentaires parmi lesquelles le fumage, le grillage, le séchage direct ou la torréfaction peuvent contribuer à la pollution des aliments par le B(a)p (EFSA, 2008). On le trouve donc dans les poissons, viandes et saucisses grillés à température élevée, mais aussi dans les produits céréaliers.

Pour la population générale non fumeur, la principale source de B(a)p est alimentaire. Une personne à alimentation équilibrée ingère en moyenne 235 ng de B(a)p par jour (EFSA, 2008). Chez les fumeurs, la fumée de tabac contribue de façon substantielle à l'exposition. Une personne fumant 20 cigarettes/jour absorbe en moyenne 105 µg de B(a)p quotidiennement (EFSA, 2008).

Les plus fortes expositions au B(a)p sont retrouvées dans l'environnement professionnel, où les sujets sont exposés sur de plus courtes périodes que dans l'environnement général mais à des niveaux plus élevés. Les activités industrielles concernées sont diverses et comprennent : la gazéification du charbon qui permet de transformer le charbon en gaz combustible, la production de coke (graphite très pur obtenu par distillation de la houille dans un four), les procédés utilisant le goudron de houille (étanchéité des toitures, revêtements routiers...), l'application de créosote, la production d'aluminium ou de silicium, la fabrication des électrodes, la production de carbure de calcium utilisé en spéléologie, et l'activité de ramonage des cheminées. Les mécaniciens, les tourneurs et les métalliers peuvent également être exposés par l'utilisation d'huiles minérales à des températures élevées et par les émissions des moteurs (Boffetta et al., 1997).

1. 3. Propriétés toxicologiques

1.3.1. Toxicités aigüe et chronique

Chez la souris, les DL_{50} mesurés par voie orale sont supérieures à 1 600 mg/kg (Awogi et Sato, 1989). Par voie intra-péritonéale, les DL_{50} sont d'environ 250 mg/kg (Salamone, 1981) ou supérieures à 1 600 mg/kg (Awogi et Sato, 1989). Chez le rat, la DL_{50} par voie sous cutané est de 50 mg/kg. Il n'existe pas de données chez l'homme.

Chez le cobaye sensibilisé avec 250µg de benzo(a)pyrène 2 à 3 semaines avant une exposition de 24 heures à des solutions dont les concentrations varient de 0,001 à 1 % de B(a)p dans l'acétone ou l'huile d'olive une hypersensibilité de contact a été observée (Old et al., 1963). Chez la souris, des effets analogues ont été observés et ont permis de déterminer un LOAEL (Lowest Adverse Effect Level) de 120 µg pour l'allergie de contact (Klemme et al., 1987).

Lors de l'exposition, par voie nasale à un aérosol de benzo(a)pyrène chez le rat Fisher, 2 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines à la concentration de 7,7 mg/m³ (0,75 ppm), aucun effet n'a été observé, notamment au niveau pulmonaire et nasal (Wolff et al., 1989).

Des rats exposés par voie orale à des doses journalières de 50 ou 150 mg/kg de B(a)p quotidiennement pendant 4 jours présentent une diminution de l'activité carboxylestérase de la muqueuse intestinale. De plus, un NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) de 150 mg/kg par jour a été établi pour les effets gastriques, hépatiques et rénaux (Nousiainen et al., 1984).

Deux études ont montré que chez la souris possédant un récepteur Ah de forte affinité (dite sensible) et exposée à 120 mg/kg/j de benzo(a)pyrène, la mort survient après 3 semaines (Robinson et al., 1975) ou 26 semaines d'exposition. Le mécanisme d'action serait de type myélotoxique (Legraverend et al., 1983).

1.3.2. Effets du B(a)p sur la santé

L'effet du B(a)p sur la santé est principalement de type chronique liés à leur cancérogénicité. Selon les résultats d'études épidémiologiques, il a été démontré dans divers secteurs professionnels que l'exposition aux HAP entraîne une augmentation du risque de survenue de cancers du poumon, de la peau et de la vessie (Boffetta et al., 1997). Des cancers du poumon, des tumeurs de la peau et du scrotum sont observés chez les salariés de cokeries, de production d'aluminium, chez les ramoneurs, ainsi que chez les ouvriers effectuant des revêtements routiers (Pavanello et al., 1999). En environnement, une corrélation significative entre les HAP contenus dans les cigarettes et le cancer du poumon a également été établie. Le benzo(a)pyrène altère l'immunité humorale et cellulaire, les cellules B sont plus sensibles que les cellules T (Xue et al., 1991).

Chez les adultes, l'exposition au B(a)p est associée à une morphologie altérée, à une diminution du nombre de spermatozoïdes et à une diminution du nombre d'œufs. Chez l'homme, le B(a)p a été associé à la réplication chromosomique et les erreurs d'ADN modifié dans les gamètes (spermatozoïdes et ovules) (Denissenko et al., 1996).

2. Absorption et distribution

2.1. Absorption

Le B(a)p est rapidement absorbé par les voies respiratoire, digestive ou cutanée. Il a été démontré sur un modèle *in vitro* de peau d'origine humaine que 3% d'une dose d'exposition de B(a)p est absorbé après 24 heures. On retrouve la substance dans les canaux lymphatiques thoraciques 3h après une administration intra-gastrique (Bonnard et al., 2007). Lorsqu'inhalé, son absorption est rapide, cependant, sa vitesse d'absorption dépend de la taille des particules sur lesquelles le B(a)p est adsorbé. Étant lipophile, le B(a)p traverse les barrières pulmonaire et intestinales par diffusion passive (IARC, 1983).

Par voie respiratoire:

Chez l'homme: l'absorption est rapide, mais dépend de la forme sous laquelle le Benzo(a)pyrène est administré et plus spécifiquement de la taille des particules sur lesquelles il est adsorbé (Kao et al., 1985).

Chez l'animal: Les recherches sur l'absorption pulmonaire de HAP ont montré l'existence d'un mécanisme de clairance mucociliaire important. En effet, les particules d'HAP remontent l'arbre pulmonaire et sont avalées, entrant ainsi dans l'organisme par la voie digestive. Une étude sur le poumon isolé de rat, d'un aérosol de benzo(a)pyrène montre clairement que celui-ci est absorbé directement par voie pulmonaire (Mitchell, 1982).

Par voie cutanée:

Chez l'homme: Une étude *in vitro* sur la peau humaine montre qu'après 24 h d'exposition au benzo(a)pyrène ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), l'absorption est estimée à 3% (Kao et al., 1985). Sur de la peau

de cadavre humaine, il est montré que $23,7 \pm 9,7\%$ du benzo(a)pyrène appliqué pénètre dans la peau (Wester *et al.*, 1990).

Chez l'animal: L'absorption par voie cutanée du [^{14}C] benzo(a)pyrène chez le rat, la souris, les singes, les cobayes est rapide et importante. L'absorption chez le rat et le singe dépend du véhicule choisi pour l'administration. Une application de 10 ppm de benzo(a)pyrène dans l'acétone sur la peau des singes montre une adsorption moyenne de $51 \pm 22\%$ et de $13,2 \pm 3,4\%$ lorsque le benzo(a)pyrène est mélangé à de la terre (Ng *et al.*, 1992).

Ingestion :

Les HAP sont rapidement absorbés au niveau intestinal, des études chez le rat ont montré que 30 à 50 % de faibles doses sont rapidement absorbées et qu'une majeure partie est rapidement métabolisée au niveau du foie (Van Rooij, 1993).

2.2. Distribution

Après absorption, le B(a)p est ensuite distribué via le sang dans les ganglions lymphatiques thoraciques, le tractus respiratoire, les reins, le cerveau, les testicules et la rate (Bonnard *et al.*, 2007). Les LDL facilitent le transport du B(a)p vers les fibroblastes et empêchent son absorption vers les hépatocytes contrairement au HDL qui le transporte vers le foie (Busbee *et al.*, 1990). Le B(a)p est aussi stocké dans les glandes mammaires et les organes riches en graisses. Par la suite, il est graduellement libéré des graisses vers la circulation sanguine (IARC, 1983).

Chez les rats exposés par inhalation, la distribution du benzo(a)pyrène absorbé est rapide, avec les niveaux les plus élevés trouvés dans le foie, l'œsophage, le petit intestin, et le sang 30 minutes après exposition. Cinq minutes après l'instillation intratrachéale du benzo(a)pyrène aux rats, les pourcentages de la dose administrée dans les tissus il y avait : poumons (59.5%), squelette (14.4%), foie (12.5%) ;sang (3.9%) ;et intestins (1.9%). À 60 minutes, les pourcentages étaient : poumons (15.4%), carcasse (27.1%), foie (15.8%), sang (1.6%), et intestins (9.9%). L'administration topique de benzo(C) pyrène en benzène aux dos rasés des souris a été suivie par une disparition biphasée de la radioactivité de l'emplacement d'application, avec des demi-vies de 40 et 104 heures (Heidelberger et Weiss, 1951).

3. Activation métabolique et élimination du B(a)p

Le métabolisme du B(a)p a lieu dans deux étapes:

Le métabolisme de la phase I, implique son interaction avec des oxydases à fonctions mixtes et formation des diol-époxydes, y compris trans-9,10-époxy-7,8-dihydrodiol B(a)p. Ce diol-époxyde est considéré le carcinogène final. Il est remarquable que B(a)p (aussi bien que l'autre HAPs) est un efficace l'inducteur des oxydases à fonctions mixtes et peut ainsi renforcer sa propre toxicité.

Le métabolisme de la phase II implique la conjugaison des intermédiaires métaboliques avec glutathion, sulfates et acides mercapturic ou glucuroniques. Ces conjugués sont beaucoup plus hydrosolubles que le composé de parent, qui permet leur rapide excrétion par l'intermédiaire du

rein. Bien que le foie soit considéré l'emplacement primaire du métabolisme, le métabolisme significatif peut se produire dans les tissus du poumon, appareil gastro-intestinal, placenta et peau. Le tissu endothélial connu pour être en particulier actif. Le benzo(a)pyrène est métabolisé au commencement par le système microsomique de mono-oxygénase du cytochrome P450 aux plusieurs l'arène les oxydes, qui peuvent réarranger spontanément aux phénols, subissent l'hydrations au transport correspondant. Le produit d'addition par liaison covalente d'un métabolite actif du B(a)p sur une macromolécule est appelé adduit. Parmi les différents types de macromolécules cités l'ADN est la plus importante dans la mesure où toute altération de sa structure peut modifier l'information génétique à sa source et avoir ainsi des conséquences irréversibles. La cancérogénicité des HAP réside dans leur capacité à former des adduits de l'ADN (Xue et al., 2005).

3.1. Les voies d'activation métabolique du B(a)p

La phase I d'activation métabolique comprend trois voies présentées dans la (figure 2) et détaillées une par la suite (Jiang et al., 2007) :

- 1) La voie de formation des diol-époxydes qui se fait par les cytochromes P450 1A1/1B1 par la mono-oxygénation et par les époxydes hydrolase.
- 2) La voie des peroxydases pour former les radicaux cations.
- 3) La voie de formation des o-quinones qui se fait par les cytochromes P450 1A1/1A2/1B1 par la mono-oxygénation, par les époxydes hydrolases, et par les l'aldo-Kéto réductases (AKRs).

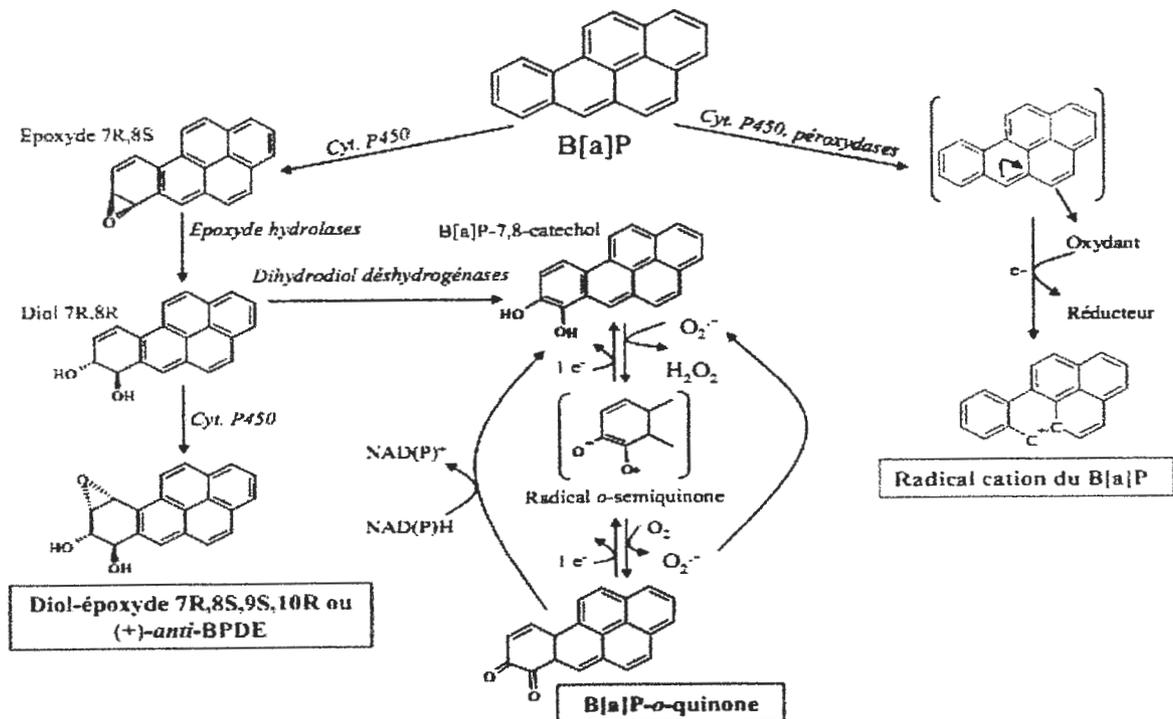


Figure 2. Voies d'activation métabolique du B(a)p (Xue et al., 2005)

3.1.1. La voie de mono-oxygénation par les Cyt P450

Les cytochromes P450 réalisent une mono-oxygénation du B(a)p en époxyde sur les carbones C7 et C8 (figure 3). L'hydrolyse de cet époxyde par un époxyde hydrolase (EH) conduit à la formation d'un dihydrodiol qui subit une nouvelle époxydation sur les carbones C9 et C10 par les CYP450 pour donner un diol époxyde ou 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyrène 9,10-oxyde (BPDE), métabolite terminal du B(a)p extrêmement réactif vis-à-vis de l'ADN. Selon la théorie de la région baie, l'anneau époxyde placé de façon adjacente à la région baie (ce qui correspond à la position 10 du groupement benzyle du BPDE), serait le site ayant la plus grande réactivité électrophile et serait le site préférentiel d'interaction covalente du BPDE avec des sites nucléophiles telles que les bases puriques de l'ADN (Yang, 1988).

Cet époxyde comporte 2 di-stéréoisomères syn et anti qui eux-mêmes possèdent 2 énantiomères optiquement actifs (+) et (-). Il existe donc 4 isomères du BPDE.

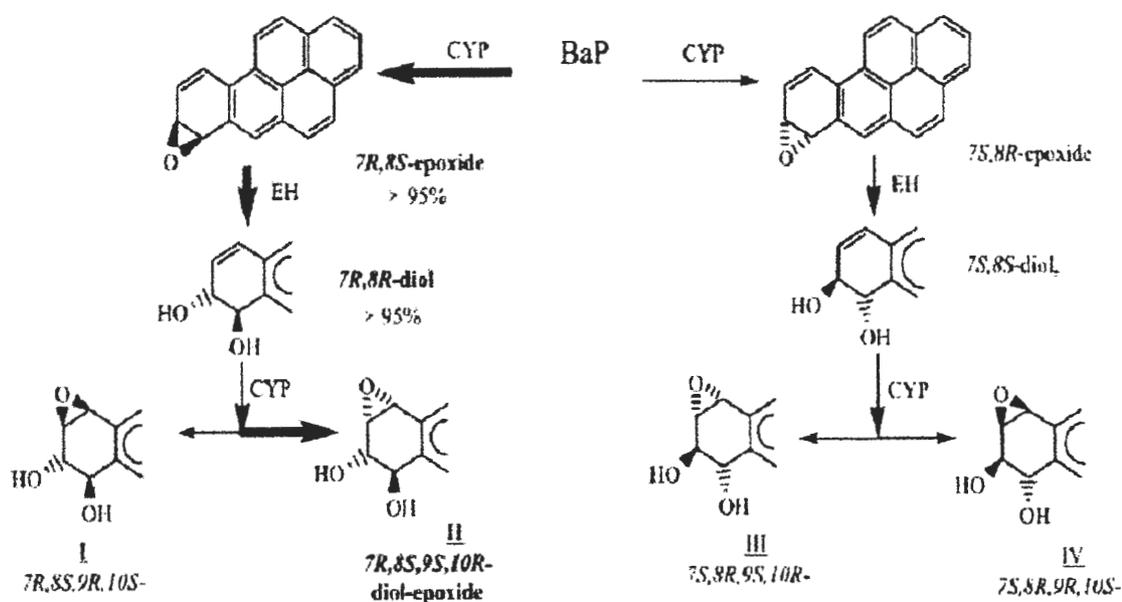


Figure 3. Voie du CYP 450 (Yang, 1988).

La formation des métabolites par les CYP et EH se fait avec une grande stéréo-sélectivité. Elle se traduit dans des microsomes hépatiques de souris par la formation presque exclusive de l'isomère 7R, 8S oxyde qui est converti préférentiellement en 7R, 8R diol. Cette réaction donne majoritairement l'isomère diol époxyde 7R, 8S, 9S, 10R c'est-à-dire l'isomère 5 (+) anti BPDE (figure 4) (Xue, 2005). Des expériences menées avec des CYP450 recombinantes humaines montrent que le B(a)p et le B(a)p-7,8-diols sont métabolisés avec un meilleur rendement par les CYP1A1 suivi des CYP1B1 puis des CYP1A2. Ces dernières sont incapables de former le 7,8 diol (Kim, 1998). La voie des CYP450 aboutit à la formation du BPDE, métabolite ultime du B(a)p, qui forme des adduits avec certaines bases de l'ADN (Kim et al., 1998).

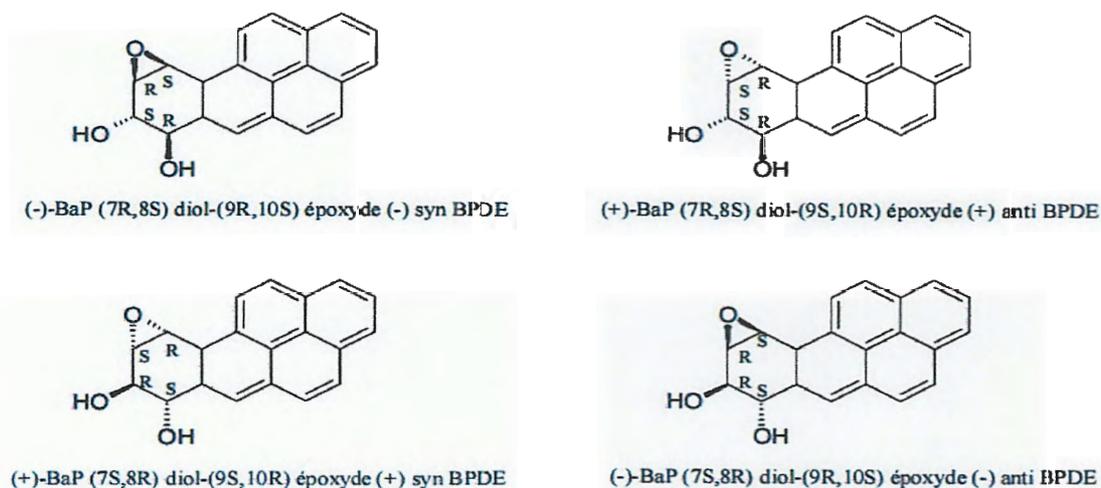


Figure 4. Isomères du Benzo(a)pyrène 7, 8 - dihydrodiol -9, 10- époxyde (Kim et al., 1998).

3.1.2. La voie d'oxydation mono- électronique par les peroxydases

La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases a pour mécanisme l'oxydation à un électron du B(a)p par les peroxydases cellulaires et/ou potentiellement par les cytochromes P450. Elle conduit à la formation de radicaux cations (figure 5). Le radical cation, contrairement au BPDE est instable chimiquement. Il peut être généré par des oxydants chimiques, mais également par électrochimie ou de façon enzymatique. La probabilité qu'un HAP perde un électron et donne naissance à un radical cation ainsi que la réactivité de ce dernier vis-à-vis de l'ADN dépend de certains facteurs :

- Un potentiel d'ionisation qui doit être faible pour permettre l'arrachement d'un électron.
- La localisation de la charge sur le radical cation et qui rend cet intermédiaire plus réactif vis-à-vis d'espèces nucléophiles.
- Une configuration géométrique optimale facilitant leur liaison covalente avec les sites nucléophiles de l'ADN.

Lors de cette voie, le carbone le plus électrophile du B(a)p est le C6 (Penning et al., 1998) . Le B(a)p activé va être transformé en phénol correspondant (6-OH-B(a)p), qui par auto-oxydation va former les 1,6-, 3,6-, ou 6,12-dione-B(a)p. Les quinones ainsi formées peuvent subir des réactions d'oxydoréduction afin d'être transformées en semi-quinones, qui peuvent être retransformées en quinones (Kim et al., 2000).

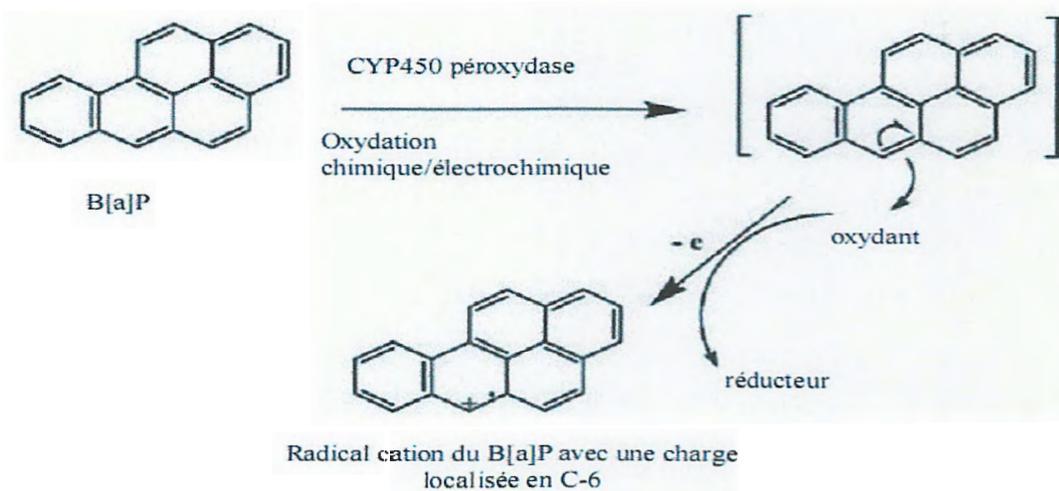


Figure 5. Formation du radical cation (Penning et al., 1998).

3.1.3. La voie de formation des quinones du B(a)p par les aldo-kéto réductases

Les premières étapes de formation des o-quinones sont communes à celles de la voie des diol-époxydes, jusqu'à l'obtention du 7,8-dihydrodiol-B(a)p. Les enzymes du CYP450 et l'EH sont donc impliquées dans cette voie de biotransformation. Ensuite, les Aldo-Kéto Réductases (AKR) sont les enzymes impliquées dans la formation des o-quinones (Jez et Penning, 2001). La voie métabolique des quinones met en jeu des dihydrodiol déhydrogénases (DD), enzymes appartenant à la superfamille des aldo-Kéto réductases (AKR). La métabolisation du B(a)p-diols par ces enzymes produit un catéchol (Smithgall, 1988).

Une fois les quinones et les o-quinones formées, les nitroréductases jouent un rôle clé dans leur détoxification. Parmi elles se trouve la NAD(P)H-quinone oxydoréductase 1 (NQO1), également appelée DT diaphorase. Son induction est contrôlée par le récepteur Ah. Chez les poissons comme chez les vertébrés supérieurs, la NQO1 est la réductase principale des quinones (Hasspieler et al., 1996). Bien que sa fonction principale soit liée à la détoxification des quinones, elle semble être impliquée dans le mécanisme de génotoxicité des quinones, par la production NADPH dépendante d'ERO. Son rôle en termes de génotoxicité apparaît comme étant plus faible chez les poissons que chez les vertébrés supérieurs. Le catéchol étant lui-même instable, il est transformé en o-quinone (7,8-dione-B(a)p) par deux oxydations successives à $1 e^-$; la première oxydation menant à la formation d'un radical semi-quinone, et la seconde à la o-quinone. Les quinones ainsi formées peuvent être retransformées en catéchol, *via* une réduction non enzymatique à $2 e^-$, ou en radical semi-quinone *via* une réduction enzymatique à $1 e^-$, catalysée par des réductases. De plus, cette voie métabolique entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (figure 6) (Hasspieler et al., 1996).

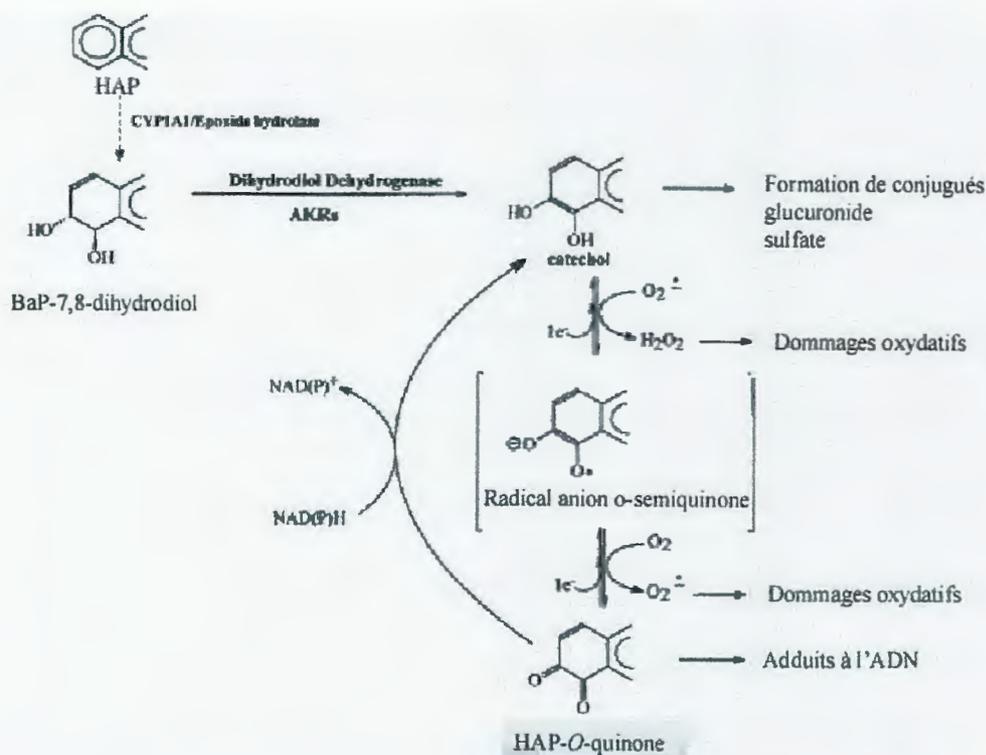


Figure 6. Voies des quinones (Smithgall et al., 1988).

3.2. L'élimination des métabolites du B(a)p par conjugaison

Comme nous venons de le voir, le métabolisme du B(a)p est complexe et entraîne la formation de nombreux métabolites, de type phénols en 1-, 3-, 7- et 9-, diols en 4,5-, 7,8- et 9,10-, quinones en 1,6-, 3,6-, et 6,12-, ou encore triols, tétraols et époxydes du B(a)p. La phase II de conjugaison permet l'élimination urinaire de ces métabolites sous forme glucurononconjuguée (figure 7A), ou sulfo-conjuguée (figure 7B), mais aussi après liaison au glutathion qui prend en charge les composés électrophiles comme les époxydes, les radicaux cations, et les quinones (figure 7C). Des combinaisons sont ensuite possibles entre ces voies de conjugaison donnant lieu à des composés di-sulfates ou di-glucuronides ou encore sulfo-glucuronide (Haufroid et al., 2005). Les réactions de conjugaison sont catalysées par action de différentes enzymes dont les principales sont décrites ci-après.

3.2.1. Conjugaison par les UDP-Glucuronosyl-transférases

Les UDP-Glucuronosyltransférases (UGT) représentent un groupe majoritaire d'enzymes de conjugaison, situé dans le réticulum endoplasmique. Elles sont dépendantes du récepteur Ah et catalysent la réaction de glucuronidation des dihydrodiols, c'est à dire la conjugaison des dihydrodiols avec le glucuronide. De plus, les quinones formées par oxydation des phénols peuvent subir une réduction pour former les diphenols correspondants, qui peuvent être conjugués au glucuronide afin d'être excrétés. Elles catalysent des réactions de conjugaison principalement au niveau du foie mais elles sont exprimées dans d'autres organes extra-hépatiques (reins, poumons, cœur, cerveau, rate, muqueuse intestinale et estomac (King, 2000).

3.2.2. Conjugaison par les glutathion-S-transférases

Quantitativement, la conjugaison au glutathion catalysée par la glutathion-S-transférase est la réaction de phase II prédominante chez de nombreuses espèces. Ces enzymes catalysent la conjugaison de composés tels que des composés aromatiques halogénés, aliphatiques, peroxydes et époxydes, carbonyle $\alpha\beta$ insaturés ou encore isothiocyanates. Sur la base de leur structure tertiaire et quaternaire, de caractéristiques immunologiques et de leur spécificité vis-à-vis de substrats modèles, elles ont été divisées en 4 classes: alpha, mu, pi, et plus récemment theta. La Glutathion-S-transférase (GST) est présente dans les fractions cytosoliques et microsomiales (Sheehan, 2001).

3.2.3. Conjugaison par les Sulfo-transférases

Les sulfotransférases (ST) sont des enzymes cytosoliques catalysant le transfert du groupe sulfonate provenant du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate à un groupe hydroxyle ou amine. Dans le cas d'une contamination aux HAP, les phénols, dihydrodiols et hydroquinones sont les substrats des ST (Glatt, 2000). Les ST constituent une voie métabolique importante pour les neurotransmetteurs et les composés phénoliques. Elles sont présentes principalement dans le foie (ST1A1), le jéjunum et les intestins (ST1A3) (Gamage, 2006).

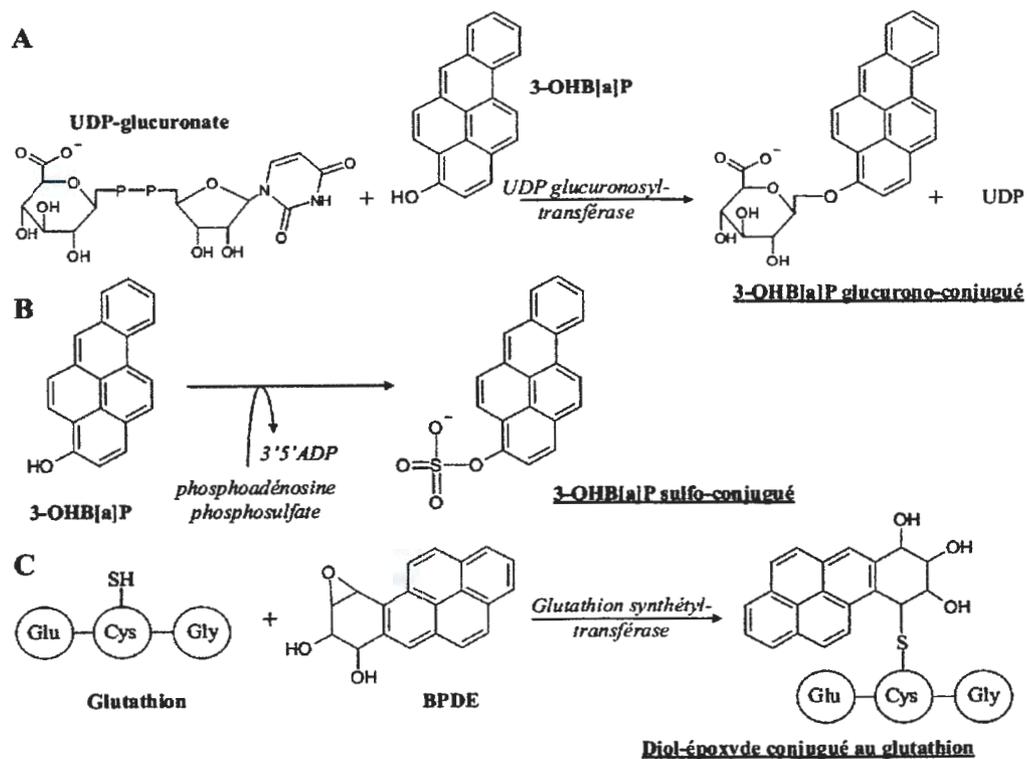


Figure 7. Voies de conjugaison des métabolites du B(a)p avec l'exemple du 3-OHB(a)p et du BPDE. A : glucurono-conjugaison, B : sulfo-conjugaison, C : conjugaison au glutathion (Haufroid et al., 2005).

CHAPITRE II.

Cibles biochimiques du B(a)p

4. Cancérogenèse pulmonaire du B(a)p

Au XVIII^{ème} siècle, le cancer du scrotum des ramoneurs de Londres a été l'un des premiers cancers professionnels identifiés. Il était dû à l'absorption cutanée des HAPs. Les cancers de la vessie, des voies nasales ou du poumon surviennent après inhalation d'HAP provenant de la combustion incomplète de matériaux organiques. On trouve plus fréquemment ce genre de cancers chez les pompiers, les travailleurs du secteur de la pétrochimie et de la sidérurgie. Une exposition par inhalation de 45.6 mg/m³ de B(a)p s'avère toxique et cancérogène (cancers du larynx, pharynx et œsophage) chez les hamsters (Thyssen et *al.*, 1981). Chez les travailleurs en alunière, un risque accru de décès par cancer, en particulier broncho-pulmonaire, a été mis en évidence par des études épidémiologiques rétrospectives (Bertrand et *al.*, 1987).

Le B(a)p est un hydrocarbure polycyclique aromatique retrouvé dans la fumée de tabac. Son métabolisme et ses conséquences pour le cancer du poumon sont résumés dans la (figure 8). Plusieurs enzymes participent à ce métabolisme et de nombreuses études épidémiologiques ont tenté de montrer leur rôle comme facteur de risque dans le cancer du poumon (Hecht, 1999).

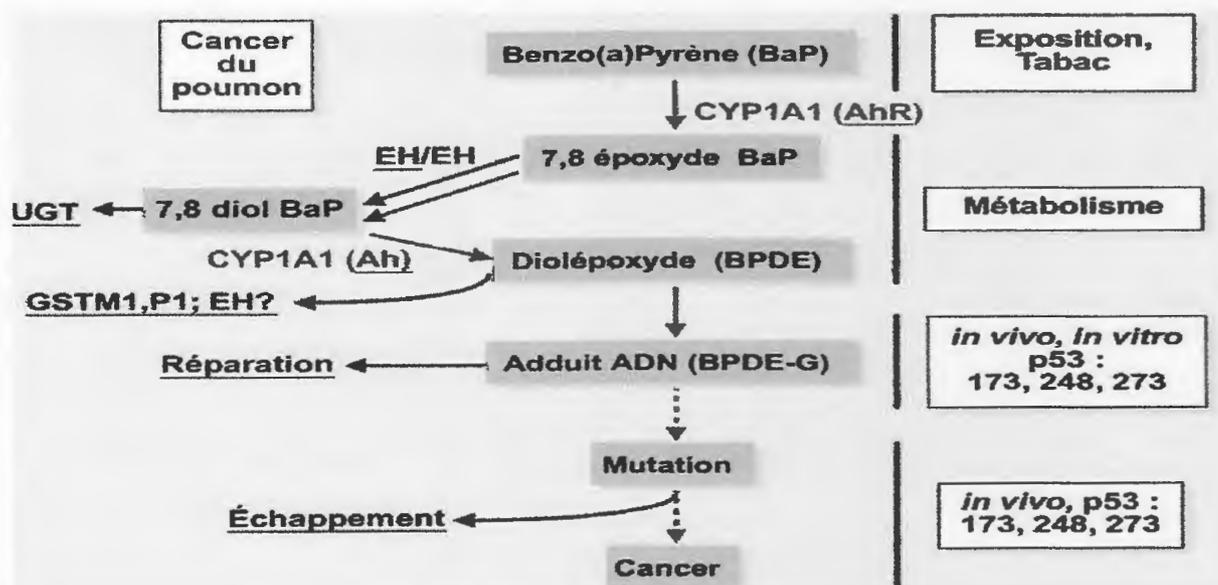


Figure 8. Schéma métabolique de benzo(a)pyrène et déclenchement du cancer du poumon à partir de ce précancérogène (Hecht, 1999).

Denissenko et Collaborateurs (1996) ont étudié la distribution des adduits du B(a)p sur les exons du gène P53 dans des cellules HeLa traitées au B(a)p-diol époxyde (BPDE) et des cellules de l'épithélium bronchique. Une formation élevée et sélective d'adduits fut décelée aux positions 157, 248 et 273 du gène. Ces mêmes positions sont des sites mutationnels majeurs dans les tumeurs du poumon chez l'homme. Le gène P53 est muté dans plus de 50% des tumeurs pulmonaires humaines. D'autres mécanismes mutagènes peuvent être la cause de développement de cancers. En effet, les adduits formés par le B(a)p peuvent provoquer des mutations ou altérations au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogène comme le RAS. Ceci contribue à la transformation de cellules normales en cellules tumorales. Ce processus est appelé l'initiation tumorale en carcinogénèse (Luch, 2005).

1. Induction des enzymes du métabolisme

La présence de HAP dans le cytoplasme engendre une induction spécifique d'enzymes métabolisant les xénobiotiques. L'Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), un récepteur cytoplasmique, a une grande affinité pour le B(a)p (Luch, 2005). Ce dernier régule l'expression d'un grand nombre de gènes codants pour les enzymes du métabolisme comme la glutathion S-transferase, l'UDP-glucuronyltransferase, l'aldehyde deshydrogenase, la NADPH quinone oxydoreductase (NQO1) ainsi que les CYP1A1 et CYP1B1 (Mc.Millan et Brodfield, 2007). En absence de ligand, le AhR est retenu inactif dans le cytoplasme sous forme d'un complexe protéique qui consiste en un dimère de Hsp90 (heat shock protéine, 90), d'un monomère d'une protéine appelée XAP2 (immunophilin-like protein hepatitis B virus X-associated protein 2) et de l'AhR lui-même. Après son passage dans le cytosol, le B(a)p se fixe sur le complexe protéique de l'AhR (figure 9) (Lin et *al.*, 2003).

Le B(a)p agit aussi *via* un récepteur nucléaire (récepteur Aryl Hydrocarbon) qui favorise l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la prolifération cellulaire. Le B(a)p est aussi impliqué dans la promotion tumorale (Luch, 2005).

Le B(a)p est considéré comme des inducteur bifonctionnel: il augmentent l'expression à la fois des CYP et des enzymes de détoxification de phase II par 2 mécanismes:

- 1^{er} mécanisme: Le B(a)p se lie directement au AhR. Une fois dans le noyau, le dimère de Hsp90 se dissocie du reste du complexe protéique et permet, de ce fait, l'interaction entre le AhR et l'Aryl Hydrocarbon nuclear translocatore (ARNT) (Pocar et *al.*, 2006). Le complexe hétérodimérique AhR-ARNT devient alors capable d'interagir avec l'ADN (figure 9); il reconnaît un motif classique contenant la séquence consensus 5'-T/GNGCGTGA/CG/CA-3' dans l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) ou drug response element (DRE) (Lin et *al.*, 2003).
- 2^{ème} mécanisme: Le B(a)p est activé par le CYP1A1 en composés électrophiles. Ces composés électrophiles activent à leur tour d'autres composés qui lient et activent des éléments de réponse (AREs ou EpREs) en amont de gènes de détoxification de phase II. Récemment il a été démontré que certains intermédiaires électrophiles, les HAP o-quinones, étaient également des inducteurs bifonctionnels, capables d'induire directement l'expression des gènes par les deux mécanismes précédemment cités (Burczynski, 2000).

Il est admis depuis peu que les enzymes de phase II faisant partie de la batterie des gènes régulés par le récepteur AhR sont reliées à une 2^{ème} batterie: celle du gène NF-E2-related factor 2 (Nrf2) impliquée dans la protection contre le stress oxydant (Nguyen, 2009). Le facteur de transcription Nrf2 se lie aux éléments de réponse aux antioxydants (ARE) présents au niveau de séquences régulatrices de différents gènes dont certains gènes de phase II (NQO1, GSTA2, UGT1A6) (Venugopal, 1998).

Le lien entre la batterie de gènes AhR et Nrf2 peut s'expliquer par le fait que Nrf2 est un gène cible de AhR (Miao, 2005). D'autre part, Nrf2 peut être activé indirectement par des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées lors des réactions enzymatiques catalysées par les CYP1A1 (Marchand, 2004). Le résultat final est une réponse adaptative qui consiste en

l'induction des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, parmi elle les CYP sont les principales induites et jouent un rôle de première importance dans le métabolisme du B(a)p (Lin *et al.*, 2003).

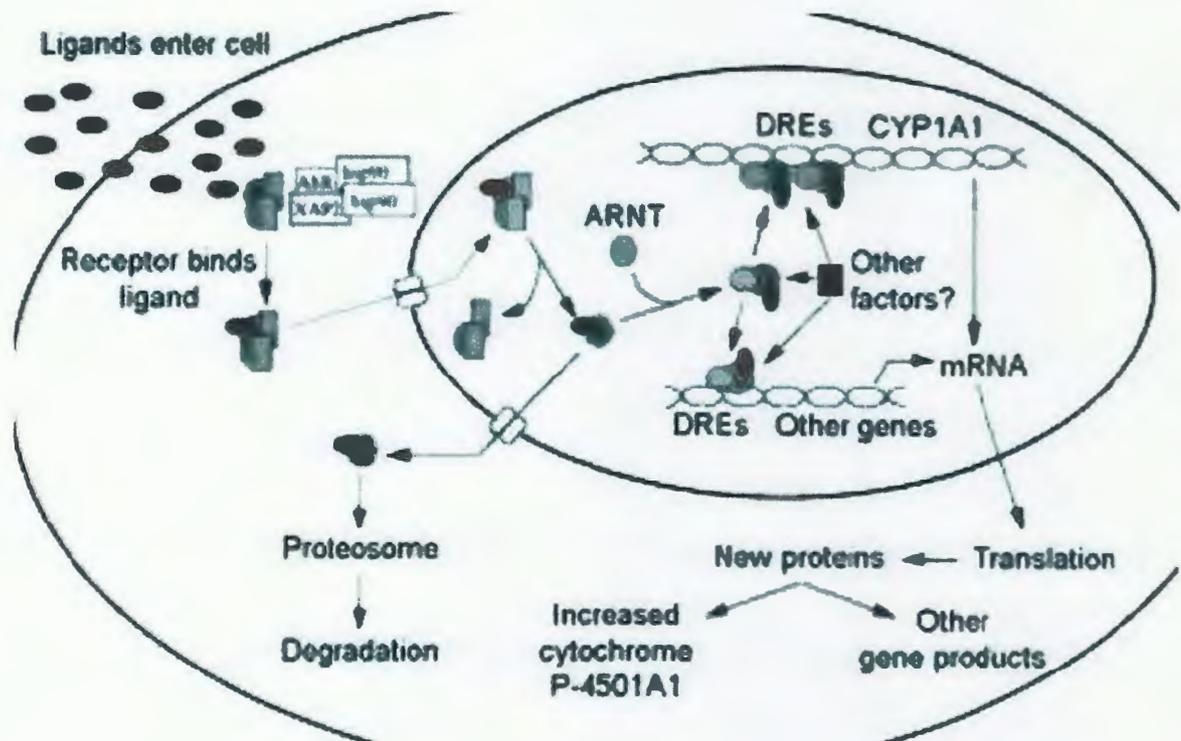


Figure 9. Mécanisme d'induction du cytochrome P450 (Denison et Nagy, 2003)

2. Formation des adduits d'ADN

Le BPDE, le radical cation du B(a)p ou encore la B(a)p-o-quinone formés lors de la phase I d'activation du B(a)p possèdent des propriétés électrophiles qui les rendent capables de se lier à l'ADN. Les sites de l'ADN concernés par ces additions correspondent aux différents sites nucléophiles des acides nucléiques. Durant la phase I, les CYP1A1 et CYP1B1 oxydent le B(a)p et forment initialement les catabolites époxydes et les diol-époxydes du B(a)p dont certains sont des cancérigènes ultimes. Ceux-ci se lient de façon covalente aux sites nucléophiles de l'ADN, généralement au niveau du groupe 2-amino de la guanine pour former l'adduit (+)-trans-anti-BPDE-N2-dG responsable de mutations au niveau des bases G:C (Nagalingam *et al.*, 2005). La liaison covalente se fait aussi au niveau de l'adénine dans le groupement amino N6 (Ling *et al.*, 2004).

Les dommages à l'ADN peuvent se produire sur les quatre bases de l'ADN (figure 10). Le plus souvent, ce sont les dommages à la guanine qui sont étudiés (Cadet *et al.*, 1999).



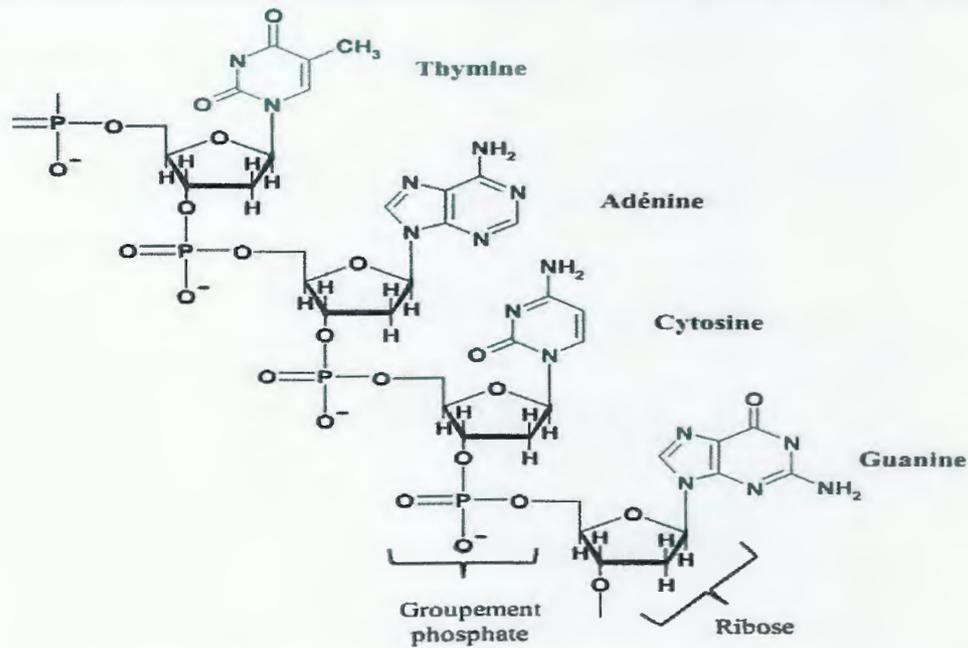


Figure 10. Configuration d'un brin d'ADN (Cadet et al., 1999).

Il existe donc plusieurs sites de formation de liaisons covalentes possibles entre un métabolite actif du B(a)p et les bases de l'ADN. La localisation de cette liaison détermine la stabilité d'un point de vue chimique de l'adduit formé. Certains adduits, comme ceux en position N2 du groupement exocyclique de la dGuo, sont stables et ne peuvent être éliminés que s'ils sont pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN. D'autres adduits, notamment ceux en position N7 de la guanine (Gua), sont caractérisés par une instabilité chimique qui entraîne la rupture spontanée du lien N-glycosidique et ainsi la formation d'un site abasique par la perte de la base lésée (figure 11) (Xue et al., 2005).

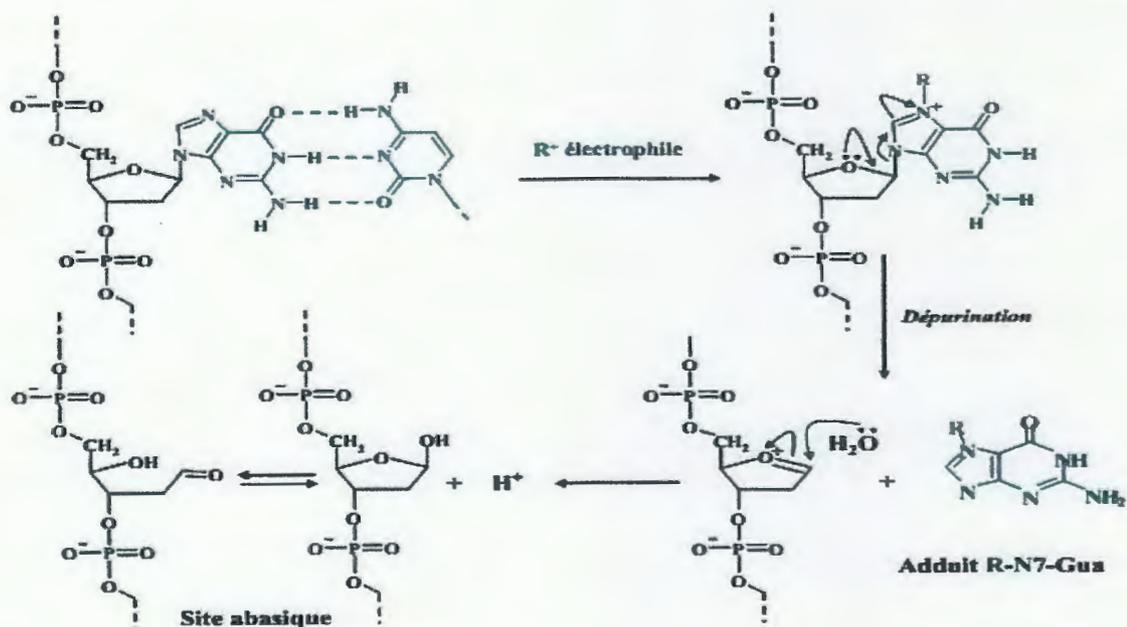


Figure 11. Représentation de la dépuration d'un adduit formé en N7 de la Gua par un électrophile R^+ (Xue et al., 2005).

Les lésions de l'ADN spécifiques de chacune des trois voies métaboliques d'activation du B(a)p sont les suivants:

2.1. Les adduits de la voie du BPDE

Le BPDE se lie préférentiellement aux groupes amino-exocycliques de la désoxyguanosine (dGuo) et désoxyadenosine (dAdo) de l'ADN (Dipple, 1994). Les adduits principaux du BPDE se forment sur les atomes N2 de la dGuo et N6 de la dAdo (Marie, 2008) (figure 12). Des adduits se forment de façon minoritaire en position N4 de la dCyd (Wolfe, 2004) et dans une moindre mesure sur l'atome N7 de la Gua. Cette dernière liaison est déstabilisatrice et donne naissance à un adduit dépurinant (Osborne, 1978). L'activation métabolique de certains HAP peut conduire à la formation de 4 isomères du BPDE, chacun pouvant générer 2 adduits cis ou trans en fonction de l'ouverture de l'époxyde lors de la liaison au résidu dAdo ou dGuo dans l'ADN. Les adduits qui se forment majoritairement sont issus de l'isomère 7R, 8S, 9S, 10R sur la dGuo (Sayer, 1991).

In vivo, la formation des adduits BPDE à l'ADN au niveau des différents organes dépend de la voie d'entrée du B(a)p. Chez le rat, l'exposition au B(a)p par voie intra-trachéale ou par voie orale génère un maximum d'adduits au niveau du poumon, tandis que l'exposition cutanée entraîne la formation d'un maximum d'adduits au niveau de la peau (Godschalk, 2000). Plusieurs expériences menées sur des rats exposés au B(a)p par voie intra-péritonéale montrent des niveaux d'adduits maximum au niveau du poumon (Qu, 1996).

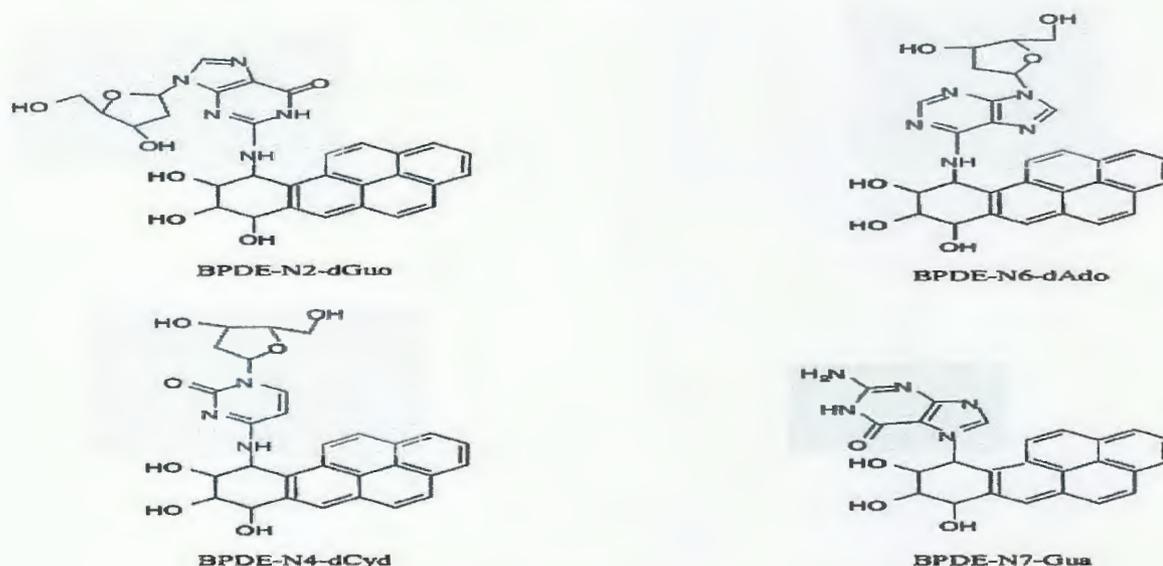


Figure 12. Principaux adduits du BPDE (Marie, 2008).

Par ailleurs, nous avons vu qu'il existe quatre isomères du BPDE. Chaque isomère peut donner naissance à deux adduits, cis ou trans selon l'ouverture de l'époxyde lors de la réaction sur l'ADN. Les adduits à l'ADN du B(a)p peuvent conduire à des mutations qui provoquent le cancer. Parmi, les métabolites réactifs et mutagènes du B(a)p on retrouve les (+)-7R,8S,9S,10R-antibenzo(a)pyrène-7,8-dihydrodiol-9, 10-époxyde (BPDE), (+)-anti-BPDE et le H7S,8R,9R,10S énantiomère, H-anti-BPDE (Miller et al., 2001).

Ces derniers compromettent la réplication de l'ADN en particulier le 10S (+)-trans-anti-BPDE-N2-dG qui perturbe la structure en double hélice et bloque les ADN polymérase induisant ainsi des mutations (Hsu et al., 2005).

La formation d'adduits avec les acides nucléiques au niveau de la peau de souris, des kératinocytes humains ainsi que les hépatocytes de rat a été observé, une réaction qui était principalement reliée au métabolite 9-hydroxy-4,5-époxyde (Jernstrom et al., 1984). Les adduits sont aussi responsables de la formation de tumeurs chez la souris (Buening et al., 1978).

2.2. Les adduits du radical cation du B(a)p

Le radical cation du B(a)p, très réactif, est également capable de former des adduits à l'ADN sur tous les sites nucléophiles de la dGuo ainsi qu'en N7 de la dAdo. De plus, les radicales semi-quinones produites à partir des quinones issues de cette voie de biotransformation, ont été démontrés comme pouvant s'additionner à l'ADN, ainsi qu'aux protéines (Shimada, 2006).

Les adduits dépurinants B(a)p-N7-Gua, B(a)p-C8-Gua ainsi que les adduits stables B(a)p-C8 dGuo, B(a)p-N2-dGuo et B(a)p-N3-dGuo ont ainsi pu être obtenus. En présence de dAdo, seule la formation de l'adduit dépurinant de l'adénine (Ade) B(a)p-N7-Ade est observée (Ramakrishna et al., 1992). *In vivo*, sur de la peau de souris traitée au B(a)p, il apparaît que les adduits du radical cation sont majoritairement dépurinants (Chen et al., 1996). Les différents adduits de cette voie sont représentés ci-dessous (figure 13).

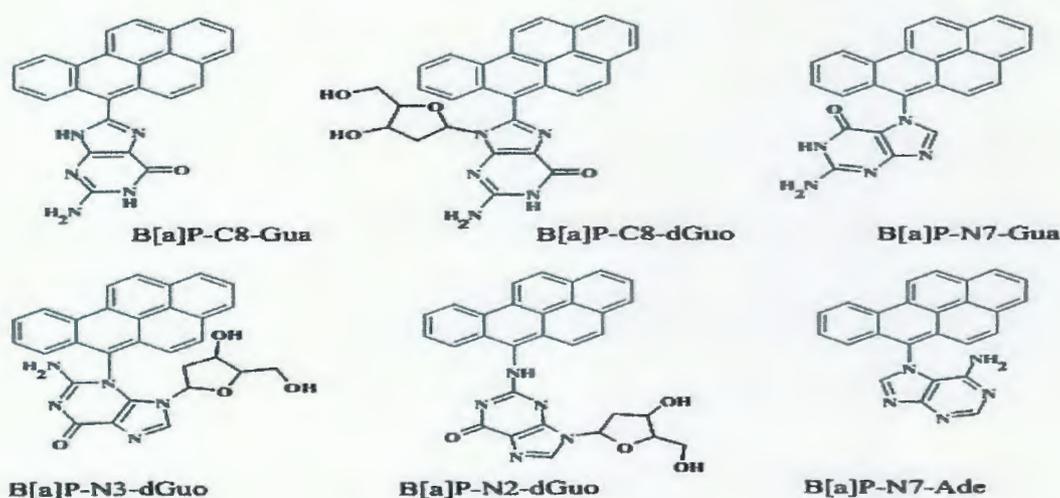


Figure 13. Principaux adduits de l'ADN du radical cation du B(a)p (Chen et al., 1996).

2.3. La génotoxicité de la voie des quinones du B(a)p

Du point de vue génotoxique, la B(a)p-o-quinone serait capable de se fixer à l'ADN. La formation de quatre adduits stables sur la dGuo, de deux adduits sur la dAdo, et d'un adduit dépurinant B(a)p-o-quinone-N7-Gua a ainsi été mise en évidence *in vitro* (McCoull et al., 1999). Concernant la formation des adduits de cette voie *in vivo*, une seule étude existe à ce jour et consiste en l'administration intrapéritonéale de B(a)p-o-quinone à des rats. Aucun adduit n'a pu être détecté dans le foie, les poumons et les leucocytes 72 h après le traitement (Balu et al., 2004). En fait, l'action toxique majeure de cette voie pourrait être essentiellement de type

oxydatif par la génération d'ERO. Parmi les ERO, le radical hydroxyle OH° , formé à partir de O^{2-} et H_2O_2 , est principalement impliqué dans la génération des dommages de l'ADN. Ces dommages sont de deux types, soit le radical hydroxyle s'ajoute sur les bases de l'ADN conduisant à la formation de bases oxydées, soit il réagit avec le 2'-désoxyribose ce qui entraîne des cassures de l'ADN. De nombreuses lésions peuvent être formées suite à l'oxydation des bases de l'ADN, tant sur les purines que sur les pyrimidines. La base oxydée la plus connue est le produit d'oxydation de la dGuo en position C8 ou 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodGuo).

Le traitement d'ADN isolé avec la B(a)p-7,8-dione montre une augmentation significative de la formation de sites abasiques uniquement en conditions oxydo-réductrices. Ces sites abasiques semblent provenir essentiellement de lésions de l'ADN de type oxydatif, et leur formation est environ 100 fois plus importante que celle des sites abasiques issus des adduits dépurinants de la B(a)p-7,8-dione formés sans conditions oxydo-réductrices (Park et al., 2006). De plus, la fréquence des mutations du gène p53 exprimé par des levures augmente de façon dose-dépendante avec la quantité de B(a)p-7,8-dione uniquement en conditions oxydo-réductrices, ce qui confirme l'importance de la voie oxydative (Shen et al., 2006).

Par ailleurs, la voie de formation des quinones du B(a)p semble occuper une place importante dans le processus de cancérogénicité du B(a)p puisqu'il a été montré que la B(a)p-dione pourrait activer les cyt. P450 et augmenter de ce fait la formation d'adduits du BPDE par la plus grande métabolisation du B(a)p. Pour étudier les deux voies enzymatiques de l'AKR 1A1 et du cyt. P450 1B1 sur l'activation du B(a)p-diol, des cellules broncho alvéolaires H358 n'exprimant aucune des deux enzymes sont transfectées de manière à exprimer l'une ou l'autre des enzymes ou les deux. Dans les cellules n'exprimant pas le cyt. P450 1B1, la formation de tétraol provenant de l'hydrolyse du BPDE est pourtant observée, signifiant que la B(a)p-dione pourrait être un inducteur du cyt. P450 1B1. Cette hypothèse est confirmée par la mise en évidence de l'induction de l'expression du Cyt. P450 1B1 par la B(a)p-dione de façon temps et dose-dépendante.

Notons que le B(a)p-diol induit cette expression de façon significativement moins importante et l'anti-BPDE n'entraîne aucune induction (Jiang et al., 2006). De même, cela a été mis en évidence par l'étude de la cinétique de formation des adduits du BPDE dans des cellules broncho alvéolaires humaines H358 exprimant ou non les gènes des Cyt. P450 1A1 et 1B1, et de l'AKR 1A1. Dans les cellules n'exprimant pas les Cyt. P450 1A1 et 1B1, la formation des adduits du BPDE est observée avec un retard de 3 h par rapport aux cellules exprimant ces Cyt, temps nécessaire à l'induction de ces enzymes par la voie métabolique impliquant l'AKR 1A1 (Ruan et al., 2007). La voie métabolique de formation des quinones du B(a)p pourrait ainsi participer à la cancérogénicité du B(a)p par des mécanismes de type oxydatif, et par un rôle d'activation des cyt. P450.

3. Induction du stress oxydant par le B(a)p

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites à partir de la réduction partielle de l'oxygène présent dans les cellules. Les ERO sont naturellement présentes dans l'organisme à des concentrations pouvant être prises en charge par les défenses anti-oxydantes. Elles sont notamment produites lors des voies métaboliques aérobies, telles que la phagocytose, la respiration cellulaire, la phosphorylation oxydative, ou lors de la synthèse et la dégradation de

biomolécules (Azqueta et *al.*, 2009). Elles peuvent également être produites au cours des réactions de phase I de la biotransformation des HAP. Ce sont des molécules instables, et par conséquent très réactives, ce qui leur confère un potentiel toxique important. Bien que la présence d'ERO n'induit pas nécessairement de toxicité, de nombreux polluants dont les HAP induisent leur production en quantités trop importantes pour être prises en charge par les défenses anti-oxydantes, générant ainsi un stress oxydatif (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

Le stress oxydatif est le résultat de la production d'ERO au cours du métabolisme du BPD *via* la voie AKRs. Cette voie du métabolisme représente une voie potentielle de toxicité alternative à la voie promutagène de la formation du BPDE, elle a pour conséquence la génération d'anion superoxyde, de radical hydroxyle ainsi qu'un o-quinone dérivé de B(a)p, le benzo(a)pyrène-7,8-dione, métabolite hautement mutagène (figure 14).

Les AKRs sont une famille d'oxydoréductases NADPH-dépendantes cytosoliques et monomériques qui catalysent l'interconversion des aldéhydes et des cétones en alcools au cours du métabolisme des xénobiotiques. Elles jouent un rôle central dans le métabolisme des xénobiotiques, et leur fonction est aussi importante que celle des CYPs microsomaux. La 3 α -HSD/DD(AKRIC9) du rat catalyse l'oxydation du BPD en o-quinone avec production concomitante de ERO délétères. Chez l'homme les 4 membres de la sous-famille AKRIC sont capables d'oxyder le BPD en BPQ (Burczynski et Penning, 2000).

La formation de BPQ requiert les actions combinées des CYPs (IAI /IBI), de l'EH et des AKRs (figure 14). Le BPD est oxydé par les aldo-kéto réductases humaines (AKRIAI, ICI-IC4) pour former un cétole (ou ketole en anglais) qui réarrangement spontané donne un catéchol. Le catéchol est un composé instable qui subit par la suite une auto-oxydation à l'électron pour former un radical anion, l'o-semiquinone. Ce dernier va subir une seconde auto-oxydation à l'électron afin de générer un accepteur, B(a)p-7,8-dione ainsi que des ERO. Le BPQ peut être réduit par réaction enzymatique ou non enzymatique en catéchol, établissant ainsi un cycle redox dont le résultat est la génération et l'amplification des ERO jusqu'à épuisement de l'équivalent réducteur cellulaire (Jiang et *al.*, 2007).

BPQ est un métabolite électrophile et redox actif, il est considéré comme étant un agent cytotoxique modère (Burczynski et *al.*, 1999). La formation de BPQ aboutie à deux types de conséquences, chimiques et génétiques :

- Les conséquences chimiques consistent principalement en l'établissement d'un cycle redox futile (*redox cycling*). Ce cycle à répétition va provoquer un phénomène d'amplification des ERO et provoquer un stress oxydatif endogène.
- Les conséquences génétiques se traduisent principalement par l'induction des enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques.

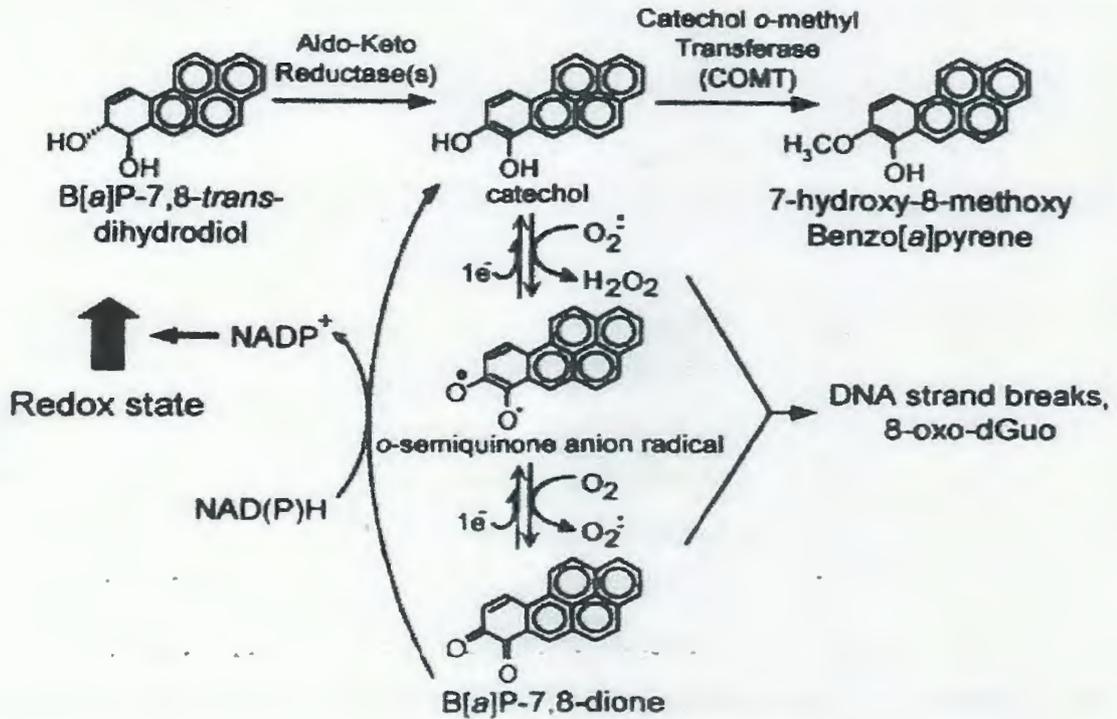


Figure 14. Activation métabolique de BPD par les AKRs et formation d'ERO (Park et al., 2008).

4. Dommages oxydatifs des biomolécules par le B(a)p

Le stress oxydant induit par le B(a)p cause des dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques à savoir les protéines, les lipides, les acides nucléiques.

4.1. Dommages oxydatifs de l'ADN nucléaire et mitochondrial

4.1.1. Oxydation des bases de l'ADN

L'oxydation des bases de l'ADN peut entraîner des mutations (Marnett, 2000). Le radical hydroxyle OH^\bullet est l'ERO la plus impliquée dans les mécanismes d'oxydation des bases de l'ADN. La plupart du temps, la formation de radicaux en C3, C4 et C5 des bases de l'ADN mène à des cassures de brins de l'ADN (Bjelland et Seeberg, 2003).

4.1.1.1. Oxydation des bases puriques de l'ADN (Guanine et Adénine)

La guanine est la base la plus sensible aux oxydations par le radical hydroxyle, l'oxygène singulet, le peroxy-nitrite et les oxydants à 1e^- (Cadet et al., 1999). Son attaque semble favorisée lorsqu'elle est placée en 5' d'une autre purine, et particulièrement s'il s'agit d'une autre guanine. L'attaque de l'ADN en position C8 par le OH^\bullet ou l'hydratation du radical cation de la guanine entraînent la formation du radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl, qui peut ensuite subir deux réactions compétitrices dont l'importance relative dépend des caractéristiques réductrices et de la concentration en oxygène moléculaire dans la solution. L'oxydation du radical 8-yl mène à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxodGuo), tandis que la réduction à 1e^- entraîne la formation du 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGuo) (Cadet et al., 2003).

L'attaque de la guanine par le radical hydroxyle peut également se faire en position C4 ou C5. Ces deux oxydations sont souvent réversibles, et en gagnant un électron, la base oxydée revient à un état non oxydé (Burrows et Muller, 1998).

4.1.1.2. Oxydation des bases pyrimidiques de l'ADN (Thymine et Cytosine)

Les radicaux cations des bases pyrimidiques sont les intermédiaires réactifs initiaux des oxydations de la thymine, la cytosine et la 5-méthyl-cytosine. L'attaque de la thymine par le radical hydroxyle se fait principalement en C5 (60%), entraînant la formation d'un radical réduit centré en C6. Le carbone C6 est quant à lui moins favorable aux réactions avec le radical hydroxyle (35%), et mène à la formation d'un radical oxydé centré en C5. Une 3^{ème} réaction se fait en proportions nettement moindres (5%) par l'arrachement d'un atome d'hydrogène au groupement méthyle, générant un radical exocyclique (Cadet et *al.*, 1999).

Les radicaux produits au cours de ces trois réactions sont ensuite convertis en radicaux peroxydes correspondants, par réaction avec l'oxygène moléculaire. Ces radicaux peroxydes sont ensuite pour la moitié d'entre eux réduits en hydro-péroxydes instables. Ces peroxydes vont être convertis en différents composés plus stables dont certains ont pu être identifiés (Cadet et *al.*, 1997).

L'oxydation de la cytosine par le radical hydroxyle se fait également principalement en C5 (87%) et en C6 (10%), et génère une cascade de produits dont l'importance relative varie selon les conditions d'oxydo-réduction du milieu. Ces différentes cascades réactionnelles peuvent entraîner la désamination du groupe amine N4 par hydrolyse. Les principaux produits de l'oxydation de la cytosine sont donc des dérivés de l'uracile. Parmi eux, le composé majoritaire est le 5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-uracile. L'oxydation de la double-liaison 5,6 de la cytosine rend la liaison glycosidique plus labile et favorise la formation de sites abasiques (Burrows et Muller, 1998).

4.1.2. Cassures de brins de l'ADN

Les cassures de brins de l'ADN peuvent être engendrées lors des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (aduits ou stress oxydant), ou directement au cours du stress oxydant via l'attaque de l'ADN par les oxyradicaux (Tarantini et *al.*, 2009). De manière générale, le clivage des brins d'ADN se fait premièrement sur le nucléoside, puis la base subit une série de réactions chimiques. Une première étape de déglycosilation catalysée par des enzymes se fait par hydrolyse acide et génère la formation d'un site abasique. Les groupements phosphates sont ensuite éliminés du site abasique (Burrows et Muller, 1998).

Le groupement phosphate 3' est éliminé en premier (β -élimination), suivi par le 5' (δ -élimination). Les purines étant plus basiques que les pyrimidines, elles sont plus sensibles à l'hydrolyse de la liaison glycosidique en conditions acides. Les radicaux intermédiaires formés au cours de l'oxydation des pyrimidines peuvent entraîner des cassures de brins directement par l'arrachement d'un atome d'hydrogène du ribosyl adjacent (Burrows et Muller, 1998).

4.2. Dommages oxydatifs des lipides par le B(a)p: Péroxydation lipidique

Il est bien connu que la génération des ERO médiées résulte en l'attaque non seulement de l'ADN mais aussi d'autres composants y compris les résidus acides gras polyinsaturés des phospholipides qui sont extrêmement sensibles à l'oxydation. Le mécanisme proposé plus de deux décennies plus tôt par Butcher et collaborateurs implique la formation d'espèces Fe(II)-O₂-Fe(III) et que le taux maximal de peroxydation lipidique est observé quand le rapport Fe(II):Fe(III) est de 1 :1. Leurs résultats suggèrent que les mitochondries sont des cibles préférentielles de la peroxydation médiée par le fer qui est aussi associé avec une baisse du métabolisme dans les mitochondries (Valko et *al.*, 2006).

Les ERO produits attaquent aussi les acides gras polyinsaturés. Une fois formé le radical peroxy ROO^o peut être réarrangé par réaction de cyclisation en endopéroxyde (précurseur du malondialdéhyde) avec le MDA comme produit final de la lipoperoxydation (LPO) (Valko et *al.*, 2006). Le produit aldéhyde majeur de la peroxydation lipidique autre que le MDA est le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) et le 4-oxo-2-nonenal qui forment des adduits etheno ou heptanoetheno-à l'ADN respectivement (Park et *al.*, 2006). Le MDA peut réagir avec les bases G, A, et C de l'ADN et former des adduits M1G, M1A, et M1C (3-(2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl) pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)one) respectivement, qui sont des lésions mutagènes. Ces fréquences de mutation sont comparables à celles observée avec la 8-oxo-dG. M1G subit une ouverture rapide du cycle et forme la N2-oxopropenyl-G lorsqu'il est présent dans l'ADN double brin et non dans l'ADN simple brin ; l'interconversion du M1G en N2-oxopropenal-dG dans l'ADN conduit à la formation de cross-links inter-brin ADN-ARN ou ADN-protéine (Valko et *al.*, 2006).

Lors d'une contamination aux HAP le déséquilibre entre la production de ERO et leur neutralisation par les systèmes antioxydants correspond au stress oxydant. Ce déséquilibre peut être dû soit à une inhibition des défenses antioxydantes par les HAP ou soit à une production d'ERO trop importante pour être éliminée par les mécanismes de défense antioxydante. Ce déséquilibre en faveur de la production de ERO peut entraîner des dommages notamment au niveau des membranes cellulaires puisque les ERO altèrent la structure des lipides membranaires (Winston et Di Giulio, 1991). Ce phénomène de dégradation est appelé lipoperoxydation ou peroxydation lipidique. L'exposition à du B(a)p conduit à une augmentation de la quantité de peroxydes lipidiques, parallèlement à une diminution de la quantité de lipides peroxydables (Livingstone et *al.*, 1990). La présence de benzo(a)pyrène révèle une augmentation de MDA (Viarengo et *al.*, 1990).

4.3. Action sur les systèmes de défenses anti-oxydantes

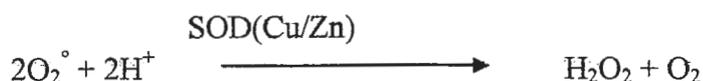
Il y a plusieurs mécanismes d'action anti-oxydante développés par les organismes vivants. Ces mécanismes vont servir entre autre à inactiver les intermédiaires clés que sont O₂⁻ et H₂O₂ (Cossu et *al.*, 1997). L'augmentation de la production de ERO peut induire ou inhiber l'activité et la synthèse de ces composés (Lopes et *al.*, 2001). Un déficit ou un dysfonctionnement de ces système engendre une augmentation des dommages sévères aux macromolécules cellulaires *via* l'oxydation de l'ADN, des membranes lipidiques (peroxydation lipidique), et de diverses protéines (Cajaraville et *al.*, 2003). Les systèmes antioxydants agissent pour prévenir le stress oxydant en éliminant les ERO et ils peuvent

être considérés comme une réponse adaptative après une exposition aux HAP, permettant à l'organisme de contrer partiellement ou totalement le stress oxydant dans un milieu pollué. Ces défenses sont de type enzymatique ou de type non enzymatique (Newman *et al.*, 1998).

4.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

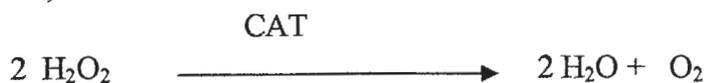
Les enzymes du système antioxydant endogène ont pour fonction de protéger les cellules des dommages oxydatifs en diminuant la quantité d'ERO, produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal, et des produits d'oxydation. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (Cossu *et al.*, 1997).

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation des ions superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. La toxicité de l'anion superoxyde se manifeste particulièrement à travers la réaction de Haber-Weiss (Newman *et al.*, 1998); selon laquelle il peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène, pour donner le radical hydroxyle hautement réactif.



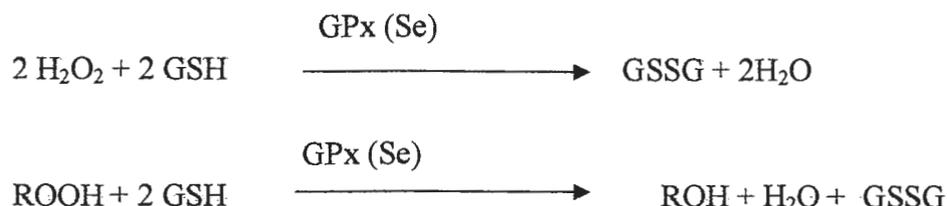
Trois formes de SOD existent chez les mammifères: une forme extra-cellulaire (Ec-SOD), une forme mitochondriale utilisant le manganèse comme cofacteur (Mn-SOD), et une forme cytosolique utilisant le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Cu/Zn-SOD) (Livingstone, 1992). Une augmentation de l'activité de la SOD érythrocytaire a été observée lors de l'exposition à au B(a)p, au contraire au niveau du sérum une diminution significative de l'activité de cette enzyme et une augmentation des taux du MDA ont été observées (Kim *et al.*, 2000).

Les catalases (CAT) catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Ce sont des enzymes péroxysomales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes (Livingstone *et al.*, 1993).



Les augmentations de l'activité catalasique sont cependant plus nettes et plus précoces que celles de la superoxyde dismutase (Di Giulio *et al.*, 1993). En effet, une augmentation de l'activité catalasique a été observée chez la moule en réponse à un surplus de production des espèces réactives de l'oxygène (Pellerin-Massicotte, 1997). De plus, des augmentations similaires ont été remarquées lors d'exposition au B(a)p (Garcia-Martinez *et al.*, 1995), de même qu'en présence de sédiments contaminés par les HAP (Livingstone *et al.*, 1993).

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoenzyme présente dans le sang, les membranes et le cytosol. En présence de glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène, elle réduit l' H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxyde (ROOH) en alcools (ROH). Il s'en suit la formation du glutathion oxydé. En présence du B(a)p, une augmentation de l'activité de la GPx a été observée. De même pour la glutathion S-transférase (GST).



La **glutathione S-transférase (GST)** réduit les hydroperoxydes en alcools mais ne réduit pas H_2O_2 . Les GST sont une famille complexe d'enzymes multifonctionnelles qui catalysent la conjugaison du glutathion réduit avec une variété de composés électrophiles. Les différentes classes de la GST qui existent chez l'homme et d'autres organismes présentent différentes propriétés catalytiques (Narbonne et *al.*, 1991).

Une diminution significative des taux des antioxydants enzymatiques (SOD, CAT, GPx et GST) a été observée chez les souris après administration orale d'une dose unique 125 mg.kg^{-1} du B(a)p (Sehgal et *al.*, 2011).

4.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Afin de se défendre contre les agressions causées par métabolites électrophiles et les radicaux libres, les cellules disposent de nombreuses voies de détoxification impliquant plusieurs molécules et qui constituent le système antioxydant non-enzymatique (Takaishi et *al.*, 2009). Les systèmes non-enzymatiques viennent renforcer l'action de ces enzymes en agissant comme un réducteur ou un capteur de radicaux (Cossu et *al.*, 1997). Il s'agit de molécules telles que la vitamine E (l' α -tocophérol), la vitamine C, la vitamine A (le β -carotène), les catécholamines, le glutathion, et l'acide urique (Winston et Di Giulio, 1991).

Les vitamines A, C et E

Surtout localisée dans les membranes cellulaires en raison de sa liposolubilité, la vitamine A est un piègeur d'oxyradicaux ($^1\text{O}_2$, OH° et ROO°) (Livingstone et *al.*, 1990). La vitamine C ou acide ascorbique a un rôle similaire dans la cellule. Hydrosoluble, elle est un piègeur d' $^1\text{O}_2$ et d' OH° . La vitamine E regroupe, quant à elle sous son terme, plusieurs isomères du tocophérol dont l' α -tocophérol, piègeur de radicaux alkoxy et peroxy (Ribera et *al.*, 1991).

Les métallothionéines

Sont des métalloprotéines caractérisées par une forte teneur en cystéine, une absence totale d'acides aminés aromatiques, une absence de pont disulfure et un contenu élevé en métaux. Ces protéines protégeraient les cellules contre les stress oxydatif, et sont connues pour avoir un effet protecteur des dommages à l'ADN causé par B(a)p (Takaishi et *al.*, 2009).

Le glutathion

Gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine (glutathion) est un tripeptide de faible poids moléculaire, très largement répandu dans la cellule. De par sa fonction thiol, il joue un rôle important dans la détoxification cellulaire soit par la conjugaison de molécules électrophiles soit par l'expression de ses propriétés anti-oxydantes. Il a la capacité de piéger directement OH° et $^1\text{O}_2^-$ et de réduire indirectement l'hydrogène peroxyde et les hydroperoxydes lipidiques en servant de cofacteur à une prooxydase ou à une réductase (Ribera et *al.*, 1991).

Une diminution significative des taux des antioxydants non enzymatiques (GSH, Les métallothionéines et vitamines A, C et E) a été observée chez les souris après administration orale d'une dose unique 125 mg.kg⁻¹ du B(a)p (Sehgal et *al.*, 2011).

5. Conséquences biologiques des lésions de l'ADN

5.1. Réparation des lésions

Dans ce travail, aux mécanismes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN liés au HAP, à savoir les adduits, les bases oxydées, les sites abasiques et les cassures de l'ADN (Cleaver, 2005).

5.1.1. Réparation par excision de nucléotides (REN)

La réparation par excision de nucléotides est un système de réparation versatile très largement répandu dans le monde vivant (Costa et *al.*, 2003). La REN est le moins spécifique des mécanismes de réparation de l'ADN du fait de sa capacité à réparer un très grand nombre de lésions sans apparentes similitudes structurales. La caractéristique commune des lésions réparées par la REN semble être plutôt une importante taille qui génère une distorsion de la double hélice d'ADN. C'est le cas des lésions alkylées par des molécules exogènes de grande taille, comme les HAP et plus particulièrement le B(a)p (Cleaver, 2005). Le système de réparation REN est connu pour être le système de réparation le plus polyvalent en terme de la diversité des lésions qu'il peut réparer (Friedberg EC, 2001). Le REN est composé de quatre étapes successives : (1) de la reconnaissance des dommages par le complexe XPC-hHR23B, (2) de l'ouverture de l'ADN de part et d'autre de la lésion grâce, entre autre, à l'action des hélicases TFIIH, XPB et XPD (remarque : les protéines XPA et RPA se fixent à l'ADN lors de cette étape), (3) de l'excision d'un nucléotide par des nucléases spécifiques (XPG et ERCC1-XPF) et finalement (4) de la resynthèse de la séquence complémentaire par l'ADN polymérase ϵ/δ et ligation du nucléotide excisé par l'ADN ligase I (Friedberg EC, 2001). Notons enfin qu'une fois réparés par le mécanisme de la REN, les adduits du B(a)p pourraient être retrouvés dans l'urine. Cependant, ceci n'a encore jamais été clairement démontré chez l'homme ou l'animal (Wallace, 1994).

5.1.2. Réparation par excision de bases (REB)

La REB concerne les lésions de faible taille qui incluent principalement les modifications de bases, et les pertes spontanées ou induites de bases générant des sites abasiques. Dans le cas du B(a)p, cela concerne les bases oxydées ou les sites abasiques générés par des lésions oxydatives ou la dépurination de certains adduits (Verly et *al.*, 1972).

Ce système de réparation de l'ADN est le mécanisme de réparation essentiel pour la réparation des dommages endogènes. Ce système fonctionne en trois étapes: tout d'abord, (1) l'ADN glycolase spécifique va venir couper la liaison qui relie la base endommagée au sucre, la transformant alors en un site abasique, (2) puis le site apurinique (AP) endonucléase coupe les liaisons phosphodiester entourant le site abasique, avec ou sans l'aide d'une AP lyase, et, finalement (3) la base complémentaire est resynthétisée et reliquée à l'aide de, respectivement, des ADN polymérases β et ϵ/δ et des ligases I et III (Simonelli V et *al.*, 2005). La figure 15 représente les systèmes de réparation : NER et BER.

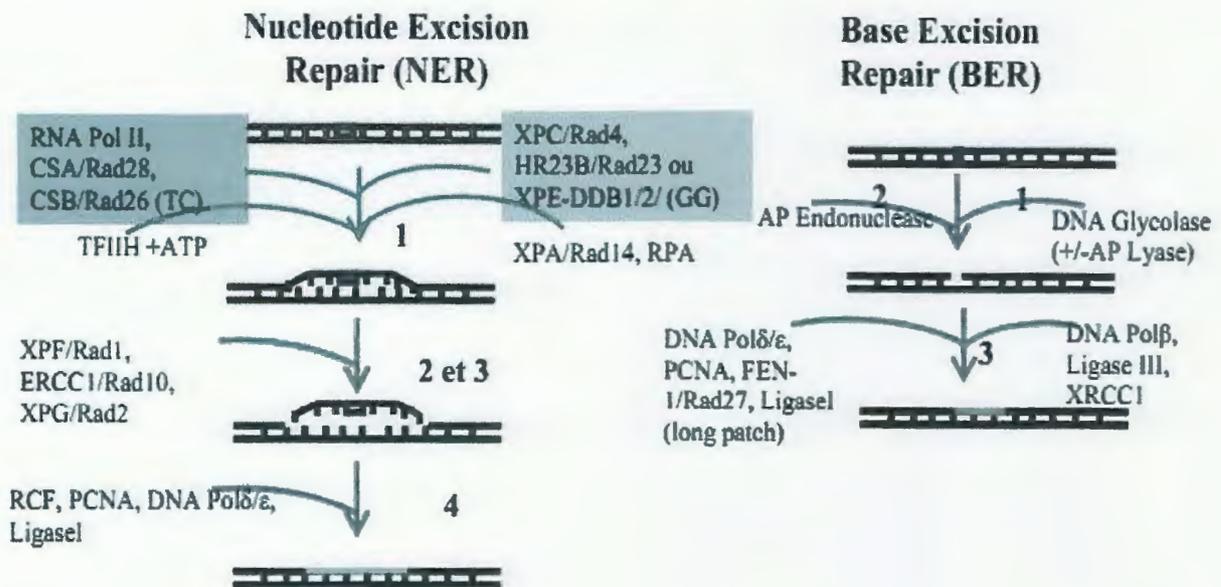


Figure 15. Les systèmes de réparation : NER et BER (Friedberg EC, 2001 ; Simonelli V et al., 2005).

5.1.3. La réparation des cassures de l'ADN

Les systèmes de réparation BER et NER ne prenant en charge que les lésions ayant lieu sur un seul brin d'ADN, d'autres mécanismes de réparation gèrent les cassures double-brins, notamment les recombinaisons homologues et non homologues, dont les périodes d'action varient en fonction du cycle cellulaire (Hoeijmakers, 2001). L'initiation de ces mécanismes se fait par des protéines kinases permettant notamment la phosphorylation d'histones dans une zone située en aval de la cassure. La réparation par recombinaison non homologue permet de rejoindre deux extrémités d'ADN même si elles ont peu d'homologie entre elles. La protéine DNA-PK est alors recrutée et activée afin de permettre l'action des protéines responsables de la préparation des extrémités d'ADN, de l'ajout ou de la suppression de nucléotides, et du maintien de l'organisation spatiale des brins d'ADN. La réparation par recombinaison homologue permet de recombiner deux brins complémentaires et semble restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire. De plus, lorsqu'un dommage bloquant l'activité des polymérase n'a pas pu être réparé, il peut alors être pris en charge par des polymérase translésionnelles, capables de polymériser des nucléotides même si le brin matrice comporte un dommage (Kanaar et al. 1998).

5.2. Réplication des lésions et survenue de mutations

Si les lésions de l'ADN sont volumineuses, comme c'est le cas pour les adduits du B(a)p, les ADN polymérase classiques sont généralement bloquées lors de la réplication au niveau de ces lésions. Depuis une dizaine d'années, l'intervention d'ADN polymérase spécialisées pour la réplication des bases endommagées lors de blocages de la réplication classique a pu être mise en évidence. Ces ADN polymérase appartiennent à la famille Y. Elles présentent une moins grande spécificité que les ADN polymérase classiques, du fait d'un site actif plus large, et peuvent par conséquent assurer la réplication au niveau de bases endommagées. Néanmoins cette réplication translésionnelle peut également être fautive et entraîner des mésappariements et potentiellement

des mutations. Dans les cellules humaines, il y a quatre polymérase de la famille Y, pol η , pol ι , pol κ , et Rev1, chacune responsable de la réplication de différentes lésions *in vitro* (Lehmann, 2005). Dans le cas des adduits du B(a)p, seules pol η et pol κ ont démontré *in vitro* la capacité d'assurer la synthèse de l'ADN au niveau des adduits du BPDE sur la dGuo et la dAdo, mais elles ne présentent pas les mêmes activités. En effet, pol κ assure la réplication exacte des adduits (\pm)-*trans*-BPDE-dGuo en insérant de façon dominante une cytosine (Cyt.) en face de la lésion, mais est entièrement bloquée par les adduits analogues sur la dAdo. A l'inverse, pol η est partiellement bloquée par les adduits BPDE-dGuo et les adduits (-)-*trans*-BPDE-dAdo, entraînant une réplication fautive, tandis qu'elle permet la synthèse translésionnelle majoritairement fidèle des adduits (+)-*trans* BPDE-dAdo. La réplication fautive ou non des différents adduits dépendrait essentiellement de leur stéréochimie (Rechkoblit et al., 2002). *In vitro*, il a ainsi été démontré que pol η insère de façon prédominante une Ade en face des adduits (\pm)-*anti-trans*-BPDE-dGuo, mais est rapidement bloquée un nucléotide après la lésion, et que l'extension de la synthèse est poursuivie par pol κ . Ainsi, la mutagénèse due aux adduits du BPDE résulterait en partie d'un mécanisme de réparation fautive en deux étapes, incluant la réplication de la lésion par pol η , et l'extension de la synthèse après la lésion par pol κ . De plus, les adduits (-)-*anti-trans*-BPDE-dGuo seraient répliqués de façon fidèle par pol κ dans une plus large proportion que les adduits (+)-*anti-trans*-BPDE-dGuo. Ceci pourrait être une explication de la plus grande mutagénicité des adduits (+)-*anti-trans*-BPDE-dGuo par rapport aux adduits (-)-*anti-trans* BPDE-dGuo (Zhang et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que les adduits du BPDE pouvaient entraîner d'autres mutations lors de l'extension de la synthèse par pol κ sur quelques nucléotides après la lésion, du fait de sa moins grande fidélité que les polymérase classiques (Kramata et al., 2003).

Pour résumer, la réplication fautive des adduits du BPDE, pouvant apparier une Ade en face d'une Gua endommagée, serait à l'origine de transversions de la Gua vers la thymine (Randerath et al., 1998). Plus récemment, la polymérase pol ζ a été identifiée chez la levure comme majoritairement responsable de la synthèse translésionnelle des adduits (+)-*anti*-BPDE et inductrice de transversions de la Gua vers la Cyt. La pol η serait alors majoritairement responsable de délétions ou d'insertion de 1 à 3 nucléotides (Xie et al., 2003). Le métabolisme du B(a)p peut entraîner également la formation d'adduits dépurinants, générant la présence de sites abasiques dans l'ADN. Chez la levure, il a été montré que les sites abasiques sont majoritairement appariés à une Ade lors de la réplication entraînant des transversions lors de dépurinations et des transitions lors de dépyrimidations (Sagher et al., 1983).

Concernant les dommages oxydatifs, la 8-oxodGuo peut être appariée à une Cyt ou une Ade lors de la réplication. Cette lésion peut donc entraîner des transversions également de la Gua vers la Thy. Notons que la glycosylase OGG1, encore appelée MutM, majoritairement impliquée dans la réparation de la 8-oxodGuo dans les cellules humaines, répare efficacement la 8-oxodGuo appariée à une dCyd mais pas lorsque celle-ci est appariée une dAdo (Rosenquist et al., 1997). Dans ce cas, une autre enzyme, appelée MutY, est alors capable d'exciser non pas la Gua oxydée mais l'Ade mésappariée (Bridges et al., 1996). Ces mécanismes impliqués dans la réparation de la 8-oxodGuo sont représentés dans la figure 16 ci-après.

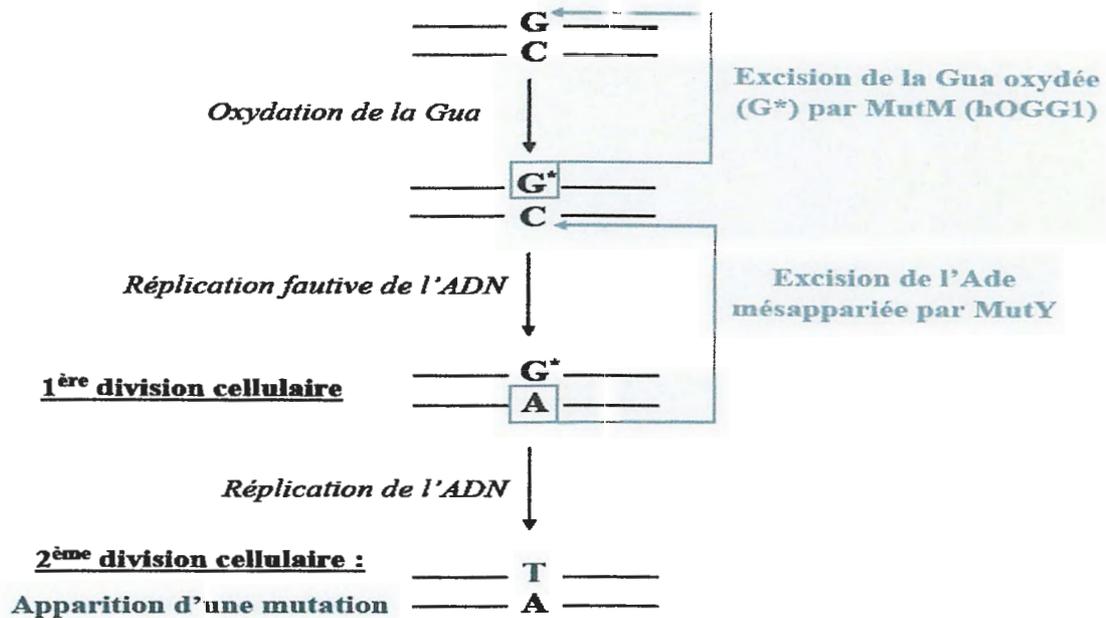


Figure 16. Mécanismes impliqués dans la réparation de la 8-oxodGua par les enzymes MutM et MutY pour prévenir l'apparition d'une mutation (Rosenquist et al., 1997).

5.3. Les arrêts de cycle cellulaire

Les arrêts de cycle permettent de limiter l'instabilité de l'information génétique à l'origine de pathologies telles que le cancer. Un effet d'inhibition de la croissance cellulaire par le B(a)p ou ses métabolites a ainsi été mis en évidence. L'incubation avec le B(a)p-7,8-diol de cellules de carcinome bronchoalvéolaire H358 mutées sur le gène p53 inhibe la prolifération cellulaire et augmente les arrêts de cycle en phase G2. Alors que la voie métabolique entraînant la formation de quinones du B(a)p par les enzymes AKR1 ne serait pas impliquée dans cet effet inhibiteur, le blocage de la voie des cyt. P450 serait déterminant (Caino et al., 2006). Le mécanisme impliqué dans l'arrêt de cycle en G2 passerait donc par la formation de dommages de l'ADN, notamment d'adduits du BPDE, qui déclencheraient les cascades de signalisation cellulaire présentées ci-dessus conduisant à des arrêts de cycle. (Jia et al., 2005). Le B(a)p activeraient la prolifération cellulaire et entraîneraient une augmentation du nombre de cellules entrant en phase S. La prolifération cellulaire passerait également par la perte de l'inhibition de contact. Le fait que ces effets soient significativement atténués dans des cellules n'exprimant plus le récepteur AhR indique l'importance de ce récepteur dans l'effet prolifératif des HAP. Ainsi, le B(a)p pourrait induire la survenue des arrêts de cycle en lien avec son rôle d'initiateur, mais également inhiber ces événements cellulaires, en lien avec son rôle de promoteur (Andrysik et al., 2006).

5.4. La mort cellulaire par apoptose

La mort cellulaire s'effectue dans l'organisme eucaryote selon plusieurs mécanismes mais principalement par la nécrose et l'apoptose (Goldsby et al., 2001). Le phénomène de l'apoptose a été décrit pour la première fois par Kerr en 1972 (Kerr et al., 1972). L'apoptose est caractérisée principalement par un renflement, occasionné par une entrée massive d'eau dans la cellule, suivi d'une condensation du contenu cellulaire et du cytoplasme (Nijhawan et al., 2000), puis de la condensation et ségrégation de la chromatine se soldant par la

dégradation de l'ADN en petits fragments. Cette série d'événements occasionnera la fragmentation de la membrane nucléaire et la formation des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques pourront être phagocytés par les cellules voisines, par les macrophages ainsi que par d'autres cellules présentatrices d'antigènes. Le contenu intracellulaire d'une cellule ayant subi l'apoptose n'entrera jamais en contact avec les autres cellules et donc n'induit pas de phénomène d'inflammation (Goldsby et al., 2001).

Les modifications morphologiques observées au cours de l'apoptose sont le résultat de l'activation d'une famille de protéases; les caspases (cystéin aspartic acid protease), protéases contenant une cystéine au niveau de leur site actif et qui clivent spécifiquement un certain nombre de substrats après un résidu d'acide aspartique. Les membres de la famille des caspases partagent une structure commune, constituée d'un pro-domaine, d'une grande sous-unité (17-20 kD) et une petite sous-unité (10-12 kD), Il existe aujourd'hui 15 caspases décrites. Les caspases présentes sous forme de zymogènes inactifs sont activées en réponse à des signaux apoptotiques et induisent le démantèlement et la déstructuration de la cellule en clivant de façon spécifique des protéines cellulaires clefs. Le rôle des caspases dans le processus apoptotique est bien établi. Cependant l'apoptose peut aussi s'effectuer indépendamment de l'activation des caspases grâce à un facteur protéique AIF (Apoptosis Inducing Factor) libéré de la mitochondrie pour être transloqué dans le noyau où il est capable à lui seul d'induire la condensation de la chromatine nucléaire et générer des fragments d'ADN (Daugas et al., 2000).

Le B(a)p posséderait un effet d'induction de l'apoptose, lié à la formation des adduits de l'ADN (Andrysik et al., 2006). Le B(a)p, et d'autres xénobiotiques, en perturbant l'intégrité de l'ADN, pourraient induire une voie apoptotique passant en premier lieu par une activation de la protéine p53 et ayant des modalités et des cascades moléculaires particulières (Norbury et Zhivotovsky, 2004).

5.4.1. B(a)p et protéines anti- et pro- apoptotiques

Le B(a)p et certains de ses métabolites, en particulier le B(a)p-7,8-dihydrodiol et le BPDE sont à l'origine d'une induction de l'apoptose dans les hépatocytes de souris Hepalcl7, et dans les lignées cellulaires humaines de lymphocytes B (lignée Daudi), d'adénocarcinomes de l'endomètre (RL95-2) (Kim, 2007), et les cellules HepG2 (Chen, 2003). Cette mort cellulaire programmée est liée à une accumulation de p53 dans les cellules Hepalcl7 (Solhaug, 2005) et nécessite l'induction des protéines du CYP1 (Chen, 2003).

En plus des signaux pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bcl-xs, Bid), il a été démontré que le B(a)p induisait également des signaux anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w) favorisant la survie cellulaire (Solhaug, 2005). L'induction de ces deux voies semblerait dépendre du taux de métabolisation du B(a)p et du type de métabolites formés. Les protéines de la famille Bcl₂ jouent un rôle important dans le contrôle de l'apoptose, Ces protéines régulent l'ouverture ou la fermeture des méga pores mitochondriaux, et la libération de cytochrome C (Holme, 2007).

5.4.2. Caractéristiques membranaires et apoptose chimio-induite

La membrane plasmique constitue la première zone d'interaction entre les xénobiotiques et la cellule, particulièrement dans le cas de composés lipophiles, qui entrent dans la cellule par simple diffusion à travers les lipides membranaires. Concernant le B(a)p, il a d'ailleurs été

démontré que suite à son interaction avec la membrane, la molécule aurait tendance à rester insérée dans la zone hydrophobe, entre les deux feuillettes lipidiques (Jiménez et *al.*, 2002). Les effets du B(a)p sur la membrane plasmique pourraient ainsi avoir de sérieuses implications sur la cytotoxicité de ce composé. En effet, les modifications précoces induites par le B(a)p auraient certainement des conséquences plus importantes sur l'action cytotoxique de ce composé. Au cours de travaux sur l'apoptose induite par le B(a)p dans la lignée hépatique F258, en parallèle de l'activation classique de la voie p53 suite à l'exposition au B(a)p, l'induction d'une voie parallèle dépendante de l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ NHE1 a été mise en évidence dans ces cellules. L'inhibition de cette voie par le cariporide (inhibiteur de NHE1) entraîne une diminution de l'apoptose d'environ 30%. Cette voie implique également la survenue de dommages mitochondriaux (dont la production d'espèces réactives de l'oxygène) et un changement du pH intracellulaire biphasique. Une alcalinisation précoce due à l'activation de NHE1, suivie d'une acidification dépendante de la mitochondrie (figure 17) (Huc et *al.*, 2006).

5.4.3. Implication de la fluidité membranaire

Le B(a)p induit une augmentation de la fluidité membranaire, détectable au niveau de la région hydrophobe des membranes. L'utilisation de stabilisants membranaires, comme le cholestérol, permet une inhibition de la fluidification, associée à une diminution de l'apoptose. Le cholestérol inhibe la fluidification des membranes et l'apoptose induite par le B(a)p, déterminée par dénombrement des noyaux présentant une morphologie apoptotique. Le cholestérol inhibe l'activation de la caspase-3, déterminée par sa capacité de clivage d'un substrat fluorescent. Le cholestérol inhibe l'apoptose induite par le B(a)p, *via* une inhibition de l'augmentation de l'entrée de Fer, qui ne semble toutefois pas se répercuter sur une inhibition du stress oxydant dans le cas du cholestérol (figure 17) (Gorria et *al.*, 2006).

5.4.4. Implication des lysosomes

Les lysosomes sont les organites les plus riches en fer libre. Étant également riches en protéases, leur participation au cours de l'apoptose, en particulier au cours d'une cascade apoptotique impliquant une augmentation d'entrée de fer et du stress oxydant semble particulièrement intéressante à étudier. Les lysosomes seraient essentiels au déroulement de la cascade apoptotique induite par le B(a)p puisque l'inhibition de leur implication par l'utilisation de la bafilomycine (BFM) réduit l'apoptose. Il faut d'ailleurs souligner que les lysosomes seraient particulièrement importants pour l'activation de la caspase-3 au cours de l'apoptose induite par le B(a)p puisque le blocage de leur action entraîne une inhibition drastique de l'activité de cette protéase (Huc et *al.*, 2004).

la BFM inhibe partiellement la peroxydation lipidique induite par le B(a)p. A l'inverse, une inhibition de l'implication mitochondriale via l'utilisation de l'oligomycine (inhibiteur de la chaîne respiratoire) entraîne une inhibition des dommages lysosomiaux induits par le B(a)p, déterminé par l'inhibition de l'augmentation de taille et/ou du nombre des lysosomes. Le fer est en effet un catalyseur des réactions de Fenton/Haber-Weiss (Kruszewski, 2003), permettant la réduction d' H_2O_2 en OH^\bullet et l'extension du stress oxydant aux protéines et lipides. Il faut de plus souligner ici que l'activateur de la caspase-3 au cours de l'apoptose reste mystérieux dans ce modèle, puisque la caspase-9, intermédiaire classique d'activation de la caspase-3 suite aux dommages mitochondriaux, n'est pas impliquée. L'importance des lysosomes dans ce modèle

suggère l'intervention d'une molécule lysosomiale dans le processus d'activation de la caspase-3. Les cathepsines, protéases lysosomiales largement décrites comme ayant un rôle essentiel dans divers modèles apoptotiques (figure 17) (Bröker et al., 2005).

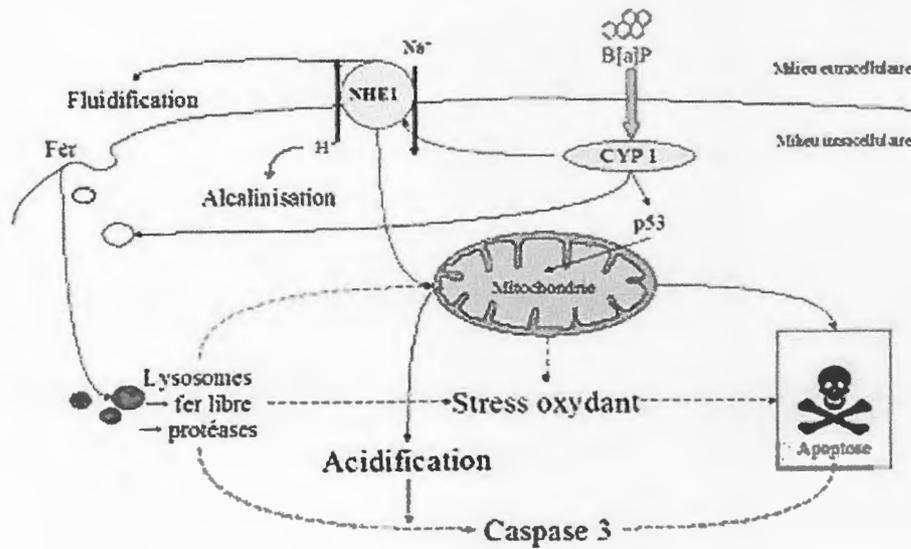


Figure 17. Schéma récapitulatif de l'implication des compartiments intracellulaires dans l'apoptose induite par le B(a)p dans les cellules F258 (Huc et al., 2003).

CHAPITRE III.

Biomarqueurs d'exposition au B(a)p

En raison de la cancérogénicité du B(a)p, il apparaît primordial de mesurer l'exposition des individus afin d'identifier les groupes à risque bien avant la survenue d'une pathologie. La mesure de l'exposition est classiquement réalisée par la mesure de dose externe par des prélèvements atmosphériques. Toutefois, ce type de mesure ne prend pas en compte divers éléments comme les différentes voies d'absorption, et les facteurs individuels de métabolisation ou encore de réparation de l'ADN. Dans cette partie, nous présenterons les différents biomarqueurs existants pour la surveillance biologique de l'exposition aux HAP.

1. Notion de biomarqueurs

La notion de biomarqueurs est issue du domaine de l'épidémiologie moléculaire née dans les années 1980. Cette discipline correspond à l'utilisation de la biologie moléculaire et de l'épidémiologie pour comprendre les causes de survenue du cancer, et améliorer la prévention de cette maladie (Perera *et al.*, 2000). En effet, la prise de conscience du caractère multifactoriel de la survenue des cancers, a permis de définir l'influence très importante de facteurs externes non-héréditaires, et notamment de la dose d'exposition à un produit cancérigène, offrant une place importante à la prévention de telles pathologies. La surveillance biologique de l'exposition des individus aux produits cancérigènes apparaît ainsi comme un outil essentiel à la prévention, et celle-ci est permise par l'étude de tout un panel de biomarqueurs pouvant être détectés bien avant la survenue d'un cancer.

Parmi ces biomarqueurs, figurent tout d'abord les biomarqueurs d'exposition. Par définition, ils correspondent à une mesure quantitative du produit cancérigène ou d'un de ses métabolites dans un milieu biologique. Le moment du prélèvement est déterminé en fonction de la cinétique d'absorption, de transformation, et d'élimination de la substance quantifiée. Il existe alors différents biomarqueurs d'exposition : certains sont représentatifs de la dose interne de toxique circulant dans l'organisme, d'autres de la dose dite efficace au niveau des molécules ciblent comme l'ADN. Les biomarqueurs d'exposition de dose interne correspondent notamment aux métabolites urinaires, et les biomarqueurs d'exposition de dose efficace aux adduits de l'ADN.

Outre les biomarqueurs d'exposition, les biomarqueurs d'effets permettent de détecter des effets biologiques plus ou moins proches de la survenue de la maladie. Contrairement aux biomarqueurs d'exposition, ils ne sont plus spécifiques de l'exposition à un toxique. La plupart des biomarqueurs d'effets sont dits précoces, comme les lésions oxydatives de l'ADN, les mutations chromosomiques correspondant aux effets cytogénétiques, ou encore les mutations ponctuelles. Certains biomarqueurs d'effets, comme l'activation ou l'inhibition de certains gènes critiques sont dits tardifs car plus proches de la survenue de la maladie.

Enfin, la dernière classe regroupe tous les biomarqueurs de susceptibilité individuelle qui incluent l'ensemble des caractéristiques modulant la susceptibilité des individus vis-à-vis de la survenue du cancer (génotypes à risque, genre, âge, etc....).

Les différents types de biomarqueurs sont représentés dans la figure 18, et sont détaillés un par la suite.

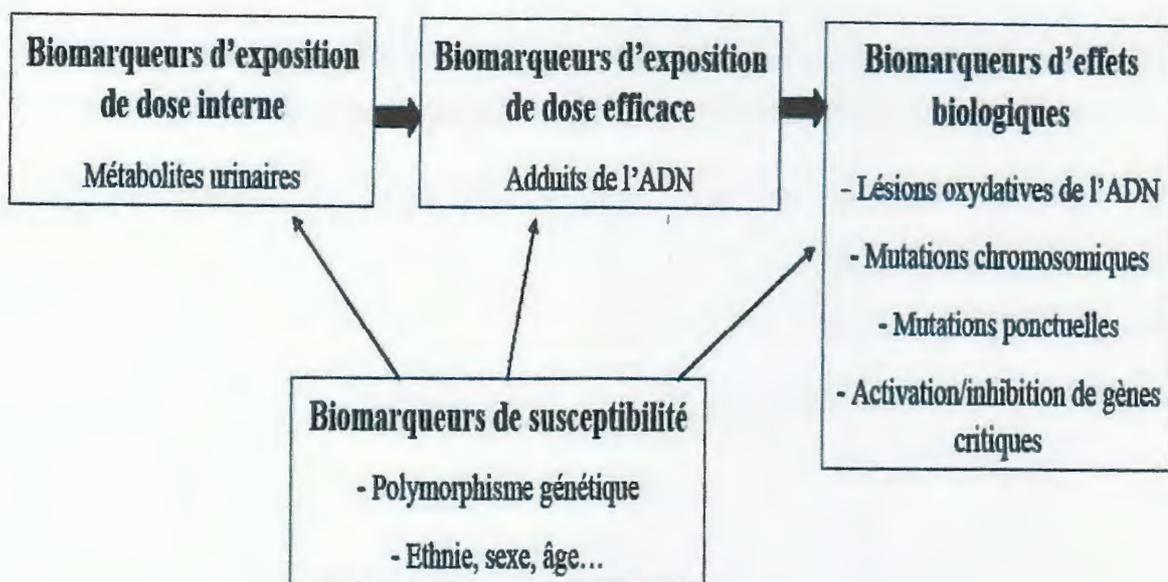


Figure 18. Les différents niveaux de biomarqueurs, d'après Perera et al., (2000).

2. Biomarqueurs de dose interne des B(a)p

Les biomarqueurs de dose interne sont d'un grand intérêt puisqu'en comparaison avec les mesures classiques atmosphériques, ils prennent en compte les différentes voies d'absorption, les variations interindividuelles de métabolisation et l'efficacité des équipements de protection individuelle (masque, gants...). Les biomarqueurs de dose interne les plus utilisés en milieu professionnel correspondent aux métabolites mesurés dans l'urine du fait de la facilité de recueil de ce milieu biologique. Les études se sont portées vers des métabolites urinaires d'HAP cancérigènes, notamment du B(a)p, comme le 3-OHB(a)p, est présent en quantités très faibles dans l'urine, si bien que sa détection est plus difficile. Ceci résulte de la faible élimination des métabolites du B(a)p par voie urinaire. Ainsi, suite à une injection intrapéritonéale de B(a)p marqué au C14 à des rats, la quantité de radioactivité excrétée dans l'urine représente environ 10% de la radioactivité totale (Yang et al., 1999).

Les faibles quantités de 3-OHB(a)p dans l'urine nécessitent une phase de purification et de concentration importante des échantillons urinaires. L'urine est généralement purifiée sur des cartouches de silice greffée à des groupements C18 puis concentrée avant l'analyse par CLHP-Fluo. Cette technique de base permet d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 90 ng/L d'urine (Hollender et al., 2000). L'ajout d'une deuxième colonne en amont de la colonne analytique, permet grâce à un système de double pompe d'obtenir une étape supplémentaire de purification de l'urine en ligne, et de diminuer la limite de détection jusqu'à 6 ng/L d'urine (Gündel et al., 2000). La purification de l'urine par commutation de colonnes (ajout de 3 colonnes de purification en amont de la colonne analytique) permet en outre d'augmenter 20 fois la sensibilité de détection par rapport à la même technique sans cette étape de purification (Simon et al., 2000). Les efforts portent également sur l'augmentation de l'intensité de fluorescence. Cela a été réalisé par l'injection d'une solution de NaOH à 0,5% via une post-colonne

(Yoshikawa et *al.*, 1990), ou par l'ajout d'acide ascorbique à 1 mg/L à la phase mobile de la CLHP (Bouchard et *al.*, 1994). Cette dernière amélioration associée à une technique de purification de l'urine par commutation de colonnes permet d'atteindre une limite de détection de 0,1 ng/L d'urine (Simon et *al.*, 2000). Dans le cas du 3-OHB(a)p, une technique de CLHP couplée à une détection de fluorescence induite par laser à basse température (CLHP-Fluo laser) a été décrite et permet d'atteindre une limite de détection de 0,5 ng/L d'urine (Ariese et *al.*, 1994). Cette technique, également appelée spectrométrie de Shpol'skii, permet d'accroître l'émission de fluorescence suite à l'excitation induite par laser, et d'augmenter fortement la résolution des spectres de fluorescence par la fixation des molécules par le froid (de l'ordre de 77 °K). Outre l'aspect analytique nécessaire pour la détection de ces métabolites, il est important d'étudier les facteurs cinétiques d'absorption, de métabolisation et d'élimination de ces composés de façon à déterminer les moments optimaux de prélèvement des échantillons. Les études de toxicocinétique des métabolites urinaires sont effectuées le plus souvent sur des modèles animaux exposés par voie intraveineuse, intrapéritonéale, orale ou cutanée. Chez le rat, la cinétique d'élimination du 3-OHB(a)p après absorption orale est similaire à celle obtenue après exposition par voie intraveineuse, indiquant que le passage des molécules au niveau de la barrière intestinale est très rapide (Bouchard et *al.*, 1997).

La cinétique d'élimination du 3-OHB(a)p après une injection en intraveineuse de B(a)p à des rats a été comparée à celle observée après injection d'un mélange de métabolites dont le 3-OHB(a)p (Bouchard et *al.*, 1996). Les profils d'excrétion sont comparables, donc la métabolisation du B(a)p en 3-OHB(a)p est très rapide. Toutefois, même après injection de 3-OHB(a)p directement, le maximum d'excrétion n'est atteint que 10 h après le traitement. Après l'exposition cutanée au B(a)p de rats, l'élimination urinaire du 3-OHB(a)p est encore plus lente, avec un pic d'excrétion maximale entre 24 et 48 h après traitement (Bouchard et *al.*, 1997).

La peau pourrait constituer un réservoir qui diffuserait et métaboliserait les molécules de façon lente, entraînant un relargage progressif des métabolites. Cette cinétique d'élimination correspond à celle obtenue après exposition par voie intrapéritonéale qui favorise un stockage dans la graisse abdominale (Bouchard et *al.*, 1996). Pour cette voie d'absorption, l'excrétion de 3-OHB(a)p augmente au cours de la semaine de traitement, et de semaine en semaine, montrant un effet intéressant cumulatif lié à cette notion de stockage (Bouchard et *al.*, 1995).

Il existe moins d'études de toxicocinétique chez l'homme, le pic d'excrétion de 3-OHB(a)p surviendrait seulement 15 h après la fin la journée de travail. Ainsi, les moments de prélèvement des échantillons urinaires sont actuellement au début de la journée suivante pour le 3-OHB(a)p (Gendre et *al.*, 2004). Outre le 3-OHB(a)p, le tétraol du B(a)p apparaît également intéressant en tant que biomarqueur de dose interne du B(a)p. Les excrétions du 3-OHB(a)p, du B(a)p-7,8-diol, du B(a)p-7,8,9,10-tétraol et du B(a)p ont été simultanément déterminées dans les urines de rats exposés à de la fumée d'asphalte en chambre d'inhalation. De la quantité totale de ces métabolites excrétés, le 3-OHB(a)p représente 30%, le B(a)p-7,8-diol 11,6%, le B(a)p-7,8,9,10-tétraol 54,4%, et le B(a)p 4% (Wang et *al.*, 2003). D'un point de vue quantitatif, le tétraol serait donc excrété dans des quantités plus importantes que le 3-OHB(a)p. De plus le tétraol est issu de l'hydrolyse du BPDE, métabolite ultime du B(a)p, si bien que le tétraol pourrait être représentatif des voies métaboliques de bioactivation conduisant à la formation des adduits du BPDE.

Toutefois, les quantités de tétraol excrétées dans l'urine restent du même ordre de grandeur que celles du 3-OHB(a)p, si bien que les mêmes contraintes analytiques sont applicables au dosage du tétraol dans l'urine. Ce dernier peut être effectué par CLHP-Fluo, mais le rendement photonique du tétraol pourrait être moins important que celui du 3-OHB(a)p du fait de sa moins grande aromaticité. Notons que la technique de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) semble intéressante pour le dosage du tétraol après dérivatisation. Pour le 3-OHB(a)p, une trop faible volatilité est obtenue, même après dérivatisation, pour utiliser cette technique (Ariese et al., 1994).

3. Biomarqueurs de dose efficace

Ainsi, la mesure de la dose interne apparaît plus précise pour estimer les risques sanitaires que la mesure des concentrations atmosphériques en HAP. Néanmoins ce type de mesure ne reflète pas la dose d'HAP qui a réellement réagi avec les cibles cellulaires sensibles telles que l'ADN. Dans ce sens, la mesure de dose efficace apparaît d'un intérêt majeur puisqu'elle prend en compte non seulement les facteurs de métabolisation mais aussi les phénomènes de formation et de réparation des lésions moléculaires (Perera et al., 2000). Parmi ces lésions, celles de l'ADN sont les plus importantes pour estimer les risques de survenue des cancers, de par leur rôle dans l'initiation des processus de cancérogénèse. Nous présenterons dans cette partie les biomarqueurs de dose efficace des HAP, à savoir les adduits de l'ADN. Dans le cas de l'ADN, les biomarqueurs de dose efficace sont également appelés biomarqueurs de dose génotoxique. Les adduits de l'ADN peuvent être mesurés dans différents tissus, mais pour des raisons pratiques et éthiques les organes cibles des HAP ne sont pas facilement accessibles à la surveillance de l'exposition. Seuls certains tissus, comme les tissus pulmonaires, peuvent être analysés lorsque la survenue d'un cancer est déclarée et qu'une intervention chirurgicale est nécessaire. Ces études permettent de mieux comprendre les mécanismes de l'initiation des cancers au niveau des organes cibles. Pour des sujets fumeurs atteints de cancer du poumon, il semble que les adduits soient présents en quantités plus importantes dans les tissus périphériques de la tumeur plutôt que dans les tissus tumoraux eux-mêmes. Une hypothèse pour expliquer cette différence serait la prolifération cellulaire rapide des tissus tumoraux entraînant un phénomène de dilution des adduits plus important dans ces tissus que dans les tissus sains. Chez ces mêmes sujets, le taux d'adduits du BPDE mesurés par CLHP-Fluo dans les cellules bronchiques non-tumorales serait corrélé à la consommation de tabac (Gyorffy et al., 2004).

Aucun adduit n'est détecté dans les cellules plus profondes du parenchyme indiquant une pénétration limitée du B(a)p présent dans la fumée de tabac dans l'épithélium respiratoire, et une initialisation des cancers au niveau des cellules bronchiques plus superficielles (Rojas et al., 2004). Classiquement, les adduits sont recherchés dans les cellules sanguines plus accessibles, et plus précisément dans les leucocytes. La question qui se pose est de savoir si la formation des adduits dans les leucocytes est représentative de celle qui survient dans les organes cibles. Chez des rats exposés à une dose de B(a)p par voie orale, intra-trachéale ou cutanée, une relation entre les taux d'adduits mesurés dans les leucocytes et dans les poumons est observée pour les trois voies d'exposition. Toutefois, les quantités d'adduits sont plus faibles dans les leucocytes que dans les poumons, de l'ordre de cinq fois pour l'exposition intratrachéale par exemple. De ce fait, la mesure des adduits dans les leucocytes pourrait sous-estimer la quantité d'adduits formés

dans les tissus cibles (Godschalk et al., 2000). De même, chez les sujets fumeurs atteints d'un cancer du poumon, les taux d'adduits seraient deux fois supérieurs dans les tissus périphériques de la tumeur que dans l'ADN lymphocytaire (Gyorffy et al., 2004).

Chez l'homme, la relation entre la quantité d'adduits mesurés dans les cellules du sang et dans les tissus pulmonaires est observée uniquement lorsque les adduits sont mesurés dans les cellules mononuclées, incluant les lymphocytes et les monocytes. D'une manière générale, l'utilisation des cellules mononuclées semble permettre d'obtenir des résultats plus pertinents que celle des leucocytes totaux (Godschalk et al., 2003). Cette constatation pourrait être expliquée par les différences de durée de vie et de quantités des différents types de leucocytes. En effet, les granulocytes et les monocytes, représentant respectivement environ 60% et 5 à 10% des leucocytes, ont une durée de vie courte de l'ordre d'une journée, et seraient représentatifs d'une exposition récente. A l'inverse, les lymphocytes comptant pour 20 à 40% des leucocytes ont une durée de vie longue de l'ordre de plusieurs années, et seraient représentatifs d'une exposition à long terme. De plus, des différences de métabolisation du B(a)p importantes semblent exister entre ces types cellulaires, les granulocytes contenant des taux d'adduits beaucoup plus faibles que les monocytes et lymphocytes (Besarati Nia et al., 2002).

L'étude des adduits de l'ADN dans les cellules du sang présente enfin l'intérêt d'être représentative de toutes les voies d'absorption (Godschalk et al., 2003). En effet, d'autres tissus périphériques peuvent être utilisés comme les frottis des cavités nasales et buccales, ou encore les lavages bronchoalvéolaires et les crachats mais ces derniers sont représentatifs de l'exposition par voie nasopharyngée uniquement (Besarati Nia et al., 2002).

Outre le type de tissu, les cinétiques de formation et d'élimination des adduits dans le tissu concerné sont à prendre en compte afin d'être en mesure de relier les taux d'adduits à l'exposition. Actuellement les études de cinétique ont essentiellement été réalisées dans des modèles animaux. L'exposition de rats à une dose unique de B(a)p par voies intratrachéale, cutanée ou orale, et la mesure des adduits formés dans quatre tissus, à savoir les poumons, la peau, l'estomac et les leucocytes, ont permis de mettre en évidence un niveau maximum d'adduits atteint deux jours après le traitement pour toutes les voies d'exposition et tous les tissus (Godschalk et al., 2000). Toutefois, les quantités d'adduits formés et leur cinétique d'élimination sur 21 jours sont différentes selon la voie d'exposition. Ainsi, alors que le taux maximum d'adduit est trois fois moins important dans les poumons après une exposition orale qu'après une exposition intra-trachéale, 74% des adduits sont encore présents 21 jours après l'exposition orale, contre seulement 34% après l'exposition intra-trachéale. De plus, la cinétique d'élimination semble varier selon les tissus. En effet, le traitement par voie orale de rats à une dose unique de B(a)p confirme la présence d'un taux maximum d'adduits deux jours après traitement dans le foie et les poumons, mais l'élimination des adduits après deux jours est beaucoup plus rapide dans le foie que dans les poumons (Briede et al., 2004).

Chez l'homme, la cinétique d'élimination des adduits formés dans les leucocytes de sujets fumeurs semble présenter deux phases après arrêt du tabac: une phase rapide d'élimination, puis une phase plus lente qui se stabilise à un niveau résiduel d'adduits. La demi-vie alors estimée des adduits dans les cellules mononuclées du sang serait de 10 à 12 semaines. Les deux phases

d'élimination des adduits pourraient être liées à la différence de durée de vie des monocytes et des lymphocytes. En effet, une semaine après traitement au coal-tar de patients atteints de psoriasis, le taux d'adduits serait de retour au niveau basal dans les monocytes et granulocytes, mais encore persistant dans les lymphocytes (Godschalk et *al.*, 2003). Enfin, certains adduits de l'ADN peuvent être retrouvés dans l'urine suite à leur dépurination. La quantité d'adduits éliminée est alors très faible, et de même que pour les métabolites urinaires, l'étape de purification et concentration de l'urine est primordiale. Environ 0,013 % du B(a)p marqué au C14 administré à des rats est ainsi éliminé sous forme de B(a)p-N7-Gua dans l'urine, et 0,008 % dans les fèces. De plus, environ 80% du B(a)p-N7-Gua éliminé dans l'urine sont excrétés le deuxième jour après traitement, tandis que 80% du B(a)p-N7-Gua éliminé dans les fèces sont excrétés le troisième jour (Rogan et *al.*, 1990).

En plus de l'exposition, les adduits de l'ADN pourraient être représentatifs du risque de survenue de cancers.

Dans l'étude de Tang et *al.*, 2001, 22000 médecins de sexe masculin ont été suivis pendant 13 ans et un prélèvement sanguin avec une mesure des adduits leucocytaires par la technique du post-marquage a été effectuée au moment de l'entrée dans la cohorte. Parallèlement, des informations sur l'histoire tabagique des sujets ont été recueillies grâce à des questionnaires réguliers. Au bout de 13 ans, 89 cas de cancers du poumon déclarés ont permis de constituer les cas de l'étude. 173 témoins ont été choisis au sein de la cohorte de manière à prendre en compte l'âge et le statut tabagique des sujets. Il s'avère que pour des sujets fumeurs ayant la même consommation tabagique évaluée en nombre de cigarettes par jour, ceux qui présentent un fort taux d'adduits lors de l'entrée dans la cohorte ont un risque trois fois plus élevé de développer un cancer 13 ans plus tard que ceux ayant un faible taux d'adduits. A l'inverse, aucune augmentation du risque de survenue de cancer n'est observée pour les sujets non-fumeurs ou ex-fumeurs présentant des taux d'adduits élevés au début de l'étude. Pour les sujets fumeurs, le taux d'adduits leucocytaires mesurés au moment du diagnostic est environ deux fois supérieur chez les cas que chez les témoins, alors qu'aucune différence significative n'est établie entre les cas et témoins non-fumeurs ou ex-fumeurs. Une méta-analyse a permis de regrouper les résultats de mesures d'adduits par post-marquage ou ELISA dans les leucocytes ou dans les tissus pulmonaires périphériques de tumeurs de plusieurs études cas-témoins réalisées chez des sujets atteints de cancers du poumon, des voies digestives, ou de la vessie. De même que précédemment, les taux d'adduits des cas sont significativement plus élevés (de 83%) que ceux des témoins uniquement chez les sujets fumeurs. Les fumeurs actuels ayant un fort taux d'adduits présentent ainsi un risque accru de développer un cancer du poumon ou de la vessie (Veglia et *al.*, 2003).

De même des sujets fumeurs atteints d'un cancer du poumon auraient entre 1,7 et 2,4 fois plus d'adduits de l'ADN mesurés par post-marquage, dans les tissus tumoraux, périphériques de tumeurs, et dans les bronches, par rapport à des sujets non-fumeurs atteints d'un cancer du poumon (Gyorffy et *al.*, 2004). Enfin, les taux d'adduits mesurés dans les zones périphériques de tumeurs sont significativement plus élevés chez les fumeurs que chez les non-fumeurs (Godschalk et *al.*, 2002). Les adduits de l'ADN sont de plus en plus étudiés en tant que biomarqueurs d'exposition génotoxique aux HAP dans différentes populations exposées.

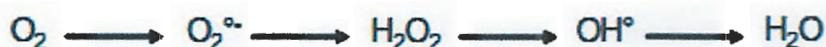
Toutefois, il est important de préciser qu'actuellement les taux d'adduits mesurés, la plupart du temps dans l'ADN leucocytaire, démontrent une corrélation peu satisfaisante avec l'exposition aux HAP (Brandt et *al.*, 2003).

4. Biomarqueurs d'effets biologiques précoces

Nous présenterons dans cette partie les biomarqueurs d'effets biologiques précoces. Comme les biomarqueurs d'exposition de dose efficace, ils peuvent être mesurés directement dans les organes cibles ou dans un tissu périphérique tel que les cellules du sang. Dans le cas des HAP, ils comprennent essentiellement les lésions oxydatives, les effets cytogénétiques et les mutations.

4.1. Les lésions oxydatives

Il existe dans tout organisme aérobie une production endogène d'ERO dans les mitochondries liée à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau pour produire de l'énergie. Cependant au cours de cette réaction, présentée ci-dessous, les ERO intermédiaires peuvent s'échapper et entraîner des dommages de type oxydatif.



La formation des lésions oxydatives est dépendante de la balance entre la production des ERO et leur désactivation par les systèmes de protection anti-oxydante. De nombreuses pathologies et divers xénobiotiques, peuvent accroître la production d'ERO et entraîner une formation importante de dommages oxydatifs. Il est donc important de préciser que la formation des dommages oxydatifs est multi-factorielle, et n'est pas spécifique du B(a)p qui, comme nous l'avons vu précédemment, fait partie des xénobiotiques qui peuvent générer des ERO au cours de leur métabolisme. La 8-oxodGuo est le biomarqueur classiquement mesuré pour évaluer les dommages oxydatifs de l'ADN. Cette lésion peut être recherchée directement dans l'ADN, comme les adduits, mais aussi dans l'urine. En effet, la 8-oxodGuo est présente en quantité non négligeable dans l'urine ce qui rend sa détection possible dans la population générale. Une question essentielle se pose néanmoins quant à l'origine de la 8-oxodGuo urinaire. Une première hypothèse a été que la 8-oxodGuo pouvait avoir une origine alimentaire, mais elle a été infirmée par des études chez l'animal et l'homme. La comparaison d'analyses d'urines de rats nourris normalement ou avec un régime sans acides nucléiques a permis de mettre en évidence l'indépendance de l'excrétion urinaire de la 8-oxodGuo vis-à-vis de l'alimentation (Park et *al.*, 1992).

Ceci a ensuite été démontré pour l'excrétion urinaire de la 8-oxo-7,8-dihydro-guanine (8-oxoGua) et de la 8-oxodGuo chez la souris (Rozalski et *al.*, 2004) et chez l'homme (Gackowski et *al.*, 2001). Tous ces résultats tendent donc à prouver que les biomarqueurs de lésions oxydatives comme la 8-oxoGua et la 8-oxodGuo mesurées dans l'urine ne sont pas d'origine alimentaire. D'autres résultats basés sur le suivi de l'ingestion d'ADN marqué isotopiquement au ^{15}N montreraient que l'ADN ingéré serait éliminé dans les fèces (Cooke et *al.*, 2005). Le renouvellement cellulaire a également été proposé en tant que source possible de 8-oxodGuo dans l'urine, mais les résultats de diverses études tendent à réfuter cette hypothèse (Cooke et *al.*, 2005).

Enfin la présence de 8-oxodGuo dans l'urine pourrait être la conséquence de la réparation de l'ADN. La réparation de la 8-oxodGuo est essentiellement prise en charge par le système de la REB entraînant l'excrétion urinaire de 8-oxoGua. Cependant, bien que le système de la REN prenne en charge essentiellement les lésions de l'ADN volumineuses, il a été mis en évidence *in vitro* que ce système pouvait également réparer de petites lésions comme la 8-oxodGuo. A ce propos, notons que la recherche d'oligomères contenant de la 8-oxodGuo dans de l'urine humaine s'est avérée infructueuse. Des oligonucléotides sont pourtant excrétés dans l'urine mais ils ne contiennent pas de dommages oxydatifs (Weimann et al., 2004). Il semblerait que d'autres mécanismes, tels que des activités endonucléasiques, interviennent alors dans la dégradation de ces oligomères suite à la REN, mais ils restent encore à élucider. Une endonucléase a également été décrite comme pouvant réparer la 8-oxodGuo. Son manque d'activité glycosylase entraînerait l'élimination de 8-oxo-3',5'-dGuo-diphosphate (8-oxo-3',5'-dGuo-DP) qui sous l'action de nucléotidases pourrait aboutir à l'élimination urinaire de 8-oxodGuo (Bessho et al., 1993).

Une dernière origine possible pour la 8-oxodGuo urinaire serait enfin liée à l'élimination de 8-oxodGuo-monophosphate (8-oxodGuo-MP) par l'enzyme 8-oxodGuo-TPase au sein des désoxynucléotides-triphosphate (dNTP) disponibles pour la réplication de l'ADN. La réparation de l'ADN semble ainsi être la voie la plus probable expliquant la présence de 8-oxodGuo dans l'urine. En plus de la 8-oxodGuo, les lésions correspondantes sur la Gua et sur la guanosine (Guo), 8-oxoGua et 8-oxo-7,8-dihydro-guanosine (8-oxoGuo) respectivement, peuvent être également mesurés dans l'urine de la population générale. Dans le cas de l'exposition aux HAP, la 8-oxodGuo est mesurée dans les leucocytes ou dans l'urine de sujets exposés. Pour des raisons pratiques, le dosage dans l'urine est souvent privilégié. Toutefois, que ce soit pour les dosages sanguins ou urinaires, il n'est pas toujours possible de relier ce biomarqueur d'effet à l'exposition aux HAP (Weimann et al., 2002).

4.2. Les effets cytogénétiques et les mutations

Bien que peu sensibles, ces biomarqueurs sont d'un grand intérêt puisqu'ils mettent en évidence des effets irréversibles. Toutefois, aucun de ces biomarqueurs n'est actuellement utilisé pour la surveillance biologique en routine, au même titre que les adduits de l'ADN. Les effets cytogénétiques correspondent aux mutations chromosomiques, ou anomalies de nombre ou de structure. Deux tests principaux permettent de mettre en évidence ces anomalies, le test des micro-noyaux et le test des échanges de chromatides sœurs. La mesure des micro-noyaux permet de détecter la perte d'un chromosome entier ou d'un fragment de chromosome par la détermination et le dénombrement, au sein d'une population cellulaire en interphase, des cellules présentant une ou plusieurs entités nucléaire sin dépendantes du noyau principal. Ce test est proposé pour le suivi de l'exposition génotoxique des populations (Fenech, 2000). Dans le cas des HAP, le nombre de micro-noyaux est significativement plus élevé dans les lymphocytes de sujets exposés à des émissions de four à coke que de sujets non-exposés (Liu et al., 2006). La mesure des échanges de chromatides sœurs, elle, permet de mettre en évidence des échanges de segments d'ADN entre des chromatides sœurs. L'augmentation de la fréquence des échanges de chromatides sœurs est classiquement rapportée chez des sujets fumeurs par rapport à des sujets non-fumeurs (DeMarini, 2004).

Un autre type d'effet biologique correspond aux mutations ponctuelles: l'analyse des mutations de l'ADN permet de mettre en évidence des anomalies à des sites spécifiques de l'ADN. Toutefois, ce type de mesure, plus lourd à mettre en œuvre que la mesure des aberrations chromosomiques, n'est pas classiquement utilisé pour le suivi de l'exposition des populations. Il permet essentiellement d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de mutagénicité des toxiques. Les techniques de biologie moléculaire comme la technique d'amplification en chaîne par polymérase, permettent actuellement de détecter des mutations à un stade précoce de la cancérogénèse, bien avant que les cellules mutées n'entrent en expansion clonale. Certains gènes sont apparus comme des gènes cibles, dans le sens où ces gènes sont fréquemment mutés dans de nombreux cancers. C'est le cas du gène suppresseur de tumeur p53 qui est muté dans 60% des cas de cancers du poumon chez l'homme (Hollstein et *al.*, 1991).

Ce gène n'est pas muté uniquement dans les cancers du poumon mais trois caractéristiques distinguent les mutations de p53 dans les cancers du poumon par rapport aux mutations de ce gène dans d'autres cancers. La première réside dans la prédominance de transversions de la Gua vers la Thy et la seconde, dans le fait que les Gua sont essentiellement mutées sur le brin non-transcrit. La troisième résulte de la mutation de certains codons dits préférentiels qui compte pour environ 50% de toutes les mutations de p53 (Shen et *al.*, 2006). Ces caractéristiques peuvent toutes être reliées à une exposition aux HAP contenus dans la fumée de cigarettes, responsables de la survenue de nombreux cancers du poumon. Précédemment, nous avons vu que les adduits du B(a)p pouvaient entraîner des transversions de la Gua vers la Thy, or celles-ci sont trois fois plus importantes dans les cancers du poumon de fumeurs que chez les non-fumeurs (Pfeifer et *al.*, 2003).

Enfin, d'un point de vue mécaniste, la distribution de l'adduit (\pm)-anti-BPDE a été cartographiée sur le gène p53 et il s'avère que cet adduit se forme préférentiellement sur certains codons, à savoir les codons 154, 157, 158, 245, 248, 249 et 273. Or ces mêmes codons, notamment les codons 157, 248 et 273 sont les sites de mutations majoritaires dans les cancers du poumon chez l'homme (Hollstein et *al.*, 1991; Denissenko et *al.*, 1996). Ces mutations caractéristiques sont ainsi considérées comme une signature des HAP dans les cancers du poumon (Hainaut et *al.*, 2001). Plus récemment, une étude sur la levure a montré que les transversions de la Gua vers la Thy sur le gène p53 pourraient être attribuées majoritairement aux dommages oxydatifs par la voie de métabolisation des quinones du B(a)p, plutôt qu'aux adduits du BPDE. En effet, la mutagénicité de la B(a)p-7,8-dione, par la formation de 8-oxodGuo en conditions oxydo-réductrices, induirait majoritairement des transversions de la Gua vers la Thy, tandis que la BPDE induirait majoritairement des transversions de la Gua vers la Cyt (Shen et *al.*, 2006). Ceci pourrait être mis en relation avec la synthèse translésionnelle des adduits du BPDE par la pol ζ qui induit majoritairement des transversions de la Gua vers la Cyt (Xie et *al.*, 2003).

5. Biomarqueurs de susceptibilité

Cette catégorie de biomarqueurs concerne toutes les caractéristiques innées ou acquises modulant la susceptibilité des individus vis-à-vis de la survenue de pathologies. C'est aussi la catégorie de biomarqueurs qui génère le plus d'interrogations sur le plan éthique (Van Damme et *al.*, 2003). Les biomarqueurs de susceptibilité incluent les prédispositions génétiques,

l'ethnicité, l'âge, le genre, l'état de santé ou encore le statut nutritionnel. Concernant les HAP, une susceptibilité particulièrement importante a été démontrée chez les enfants par rapport aux adultes, du fait notamment d'une absorption accrue, et de mécanismes de détoxification et de réparation de l'ADN réduits. De même, chez les fumeurs, les femmes ont un risque entre 1,7 et 3 fois plus élevé de développer un cancer du poumon que les hommes (Perera, 1997). La susceptibilité génétique est également de plus en plus documentée. Elle concerne essentiellement des facteurs génétiques communs qui ne sont pas responsables de pathologies à eux seuls mais qui peuvent favoriser leur survenue, tels que les gènes codant pour les enzymes intervenant dans l'activation et la détoxification des HAP. Les gènes codant pour les enzymes de phase I comme la famille des cyt. P450 sont polymorphes. Environ 10% de la population caucasienne possède une forme du cyt. P450 1A1 entraînant un risque accru de cancer du poumon chez les fumeurs. Cette augmentation de risque est plus importante, chez les fumeurs légers (de l'ordre de sept fois), que chez les gros fumeurs, pour qui elle n'est que de deux fois (Perera, 1997).

De même la mutagénicité de l'urine est significativement plus élevée chez des fumeurs ayant une forte activité métabolique du cyt. P450 1A2, par rapport à des fumeurs ayant une faible activité métabolique (Pavanello et al., 2002). En lien avec sa capacité d'induction des cyt. P450, le polymorphisme génétique du récepteur AhR peut également moduler la formation des adduits de l'ADN. Ainsi, dans deux lignées humaines d'adénocarcinome pulmonaire présentant les mêmes niveaux de récepteur AhR, l'activité enzymatique du cyt. P450 1A1 et la formation d'adduits de l'ADN ne sont fortement induites par le B(a)p que dans une des deux lignées (Chang et al., 1999). Chez l'homme, un polymorphisme rare du récepteur AhR a été associé à une inductibilité accrue de l'expression du cyt. P450 1A1 par les dioxines (Wong et al., 2001).

Il existe également un polymorphisme génétique au niveau des gènes codant pour les enzymes de phase II, telles que les époxydes hydrolases, les glutathion synthétyl-transférases (GST), les N-acétyl-transférases, et les sulfo-transférases. Par exemple, le gène GSTM1 est totalement inactif dans environ 50% de la population caucasienne, et ce phénotype a été associé à un risque plus élevé de 1,7 et 1,4 fois de survenue de cancers de la vessie et du poumon respectivement (Perera, 1997). Parallèlement au risque accru de cancer, la déficience pour le gène GSTM1 entraîne une augmentation des taux d'adduits du BPDE chez les personnes exposées aux HAP. C'est le cas de travailleurs de four à coke qui présentent une augmentation significative du taux d'adduits du BPDE dans les cellules mononuclées du sang en cas de déficience pour le gène GSTM1 (Pavanello et al., 2005). Cependant, cette augmentation du taux d'adduits dans les poumons de fumeurs pour le génotype GSTM1 déficient n'est observée que lorsque les adduits du BPDE sont quantifiés de manière spécifique. Lorsque les adduits sont mesurés de façon plus globale, avec les techniques notamment de post-marquage ou immunologiques, aucun effet du polymorphisme des gènes GSTM1 ou en encore du Cyt. P450 1A1 ne peut être mis en évidence. Ceci souligne l'importance de détecter les adduits du B(a)p de façon spécifique (Alexandrov et al., 2002).

D'autres cancers pourraient également être modulés par le polymorphisme génétique dans le cas d'une exposition aux HAP. C'est le cas du cancer du sein pour lequel le tabac apparaît comme un facteur de risque. Dans une étude cas-témoin la susceptibilité vis-à-vis du BPDE de lymphocytes mis en culture, mesurée par les cassures de chromatides, est plus importante chez

les cas que chez les témoins. Le taux de cassures des chromatides est associé à un risque plus élevé de survenue de cancer du sein, de l'ordre de trois fois. Ce risque est encore plus élevé pour les sujets de moins de 45 ans, fumeurs de longue date, consommateurs d'alcool, et porteurs du gène GSTT1 déficient (Xiong et *al.*, 2001). La susceptibilité plus grande des cas par rapport aux témoins vis-à-vis de la formation des cassures de l'ADN est reliée à une capacité de réparation de l'ADN réduite chez les cas de cancers du sein par rapport aux témoins (Shi et *al.*, 2004).

Les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN constituent ainsi également des biomarqueurs de susceptibilité. Une relation dose-dépendante entre le nombre d'allèles à risque sur trois gènes de réparation, et le taux d'adduits de l'ADN évalués par post-marquage dans les cellules mononuclées du sang a ainsi été mise en évidence dans une population de 628 individus (Matullo et *al.*, 2003).

Enfin, la nutrition peut influencer la susceptibilité des individus. La consommation de quatre tasses de thé vert pendant quatre mois entraîne une diminution de la 8-oxodGuo urinaire chez des fumeurs mais cet effet n'est pas observé lors de la consommation de thé noir. De la même façon, la complémentation nutritionnelle en vitamine C et E pendant 15 mois chez des femmes qui fument permet de diminuer de 30% le taux d'adduits du B(a)p mesurés dans les lymphocytes. Aucun effet n'a été observé chez les hommes.

Conclusion

Il ressort de cette recherche bibliographique que pour exercer des effets toxiques, le benzo(a)pyrène doit être métaboliquement activé. Le résultat de ce métabolisme est la formation des métabolites plus ou moins actifs capables de causer des lésions mutagènes, et donc, d'agir comme agents initiateurs de la carcinogenèse. Bien que la carcinogénicité de B(a)p soit principalement représentée par la formation de métabolites mutagènes, certaines investigations nous poussent à croire que le stress oxydatif joue un rôle tout aussi important dans l'induction et le développement du cancer. Les adduits de l'ADN reflètent ainsi les niveaux d'exposition mais également les facteurs individuels pouvant moduler l'action cancérigène du B(a)p. Deux voies métaboliques majoritaires conduisent à la formation d'adduits de l'ADN du B(a)p: la voie du BPDE et la voie du radical cation du B(a)p, la voie métabolique des quinones du B(a)p étant principalement une voie oxydative.

Le B(a)p est un inducteur des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Certains de ses métabolites peuvent se lier de façon covalente à l'ADN et former des adduits provoquant des mutations qui en cas de non réparation conduisent au cancer. Ces métabolites peuvent quant à eux générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) responsables de dommages oxydatifs aux protéines, aux lipides et à l'ADN. Les systèmes antioxydants agissent pour prévenir le stress oxydant en éliminant les ERO et ils peuvent être considérés comme une réponse adaptative après une exposition aux B(a)p. Le B(a)p est également un inducteur puissant de l'apoptose *via* l'implication des caractéristiques membranaires et des lysosomes dans la signalisation apoptotique.

La surveillance biologique de l'exposition aux B(a)p apparaît ainsi comme un outil essentiel à la prévention, et celle-ci est permise par l'étude de tout un panel de biomarqueurs pouvant être détectés bien avant la survenue d'un cancer. Il s'agit de biomarqueurs de dose interne, de dose externe, d'effets biologiques et biomarqueurs de susceptibilité.

En perspective on propose des études expérimentales approfondies sur la signalisation cellulaire et les changements médiés par le stress oxydatif lors des cancers induits par le B(a)p et l'effet préventif des molécules bioactives tels que les polyphénols contre ces changements.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

Alexandrov K. I., Cascorbi M., Rojas G., Bouvier E. and Bartsch H., 2002. "CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo(a)pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation." *Carcinogenesis*, 23(12): 1969-77.

Andrysik Z. J., Vondracek M., Machala P., Krcmar L., Svihalkova-Sindlerova A. and Dietrich C., 2006. "The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells." *Mutat Res*, 615: 87-97.

Ariese F. M., Verkaik G. P., Hoornweg R. J., van de Nesse S. R. and Velthorst N. H., 1994. "Trace analysis of 3-hydroxy benzo(a)pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." *J Anal Toxicol*, 18(4): 195-204.

Awogi T. and Sato T., 1989. Micronucleus test with benzo(a)pyrene using a single peroral administration and intraperitoneal injection in males of the MS/Ae and CD-1 mouse strains. *Mutat Res*, 223(4): 353-356.

Azqueta A., Shaposhnikov S. and Collins A. R., 2009. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674 (1-2): 101-108.

-B-

Balu N., Padgett W.T., Lambert G. R., Swank A.E., Richard A. M. and Nesnow S., 2004. "Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo(a)pyrene-7,8-quinone from reactions at physiological pH." *Chem Res Toxicol*, 17(6): 827-38.

Bertrand J.P., Chau N., Patris A., Mur J.M., Pham Q.T., Moulin J.J., Morviller P., Auburtin G., Figueredo A. and Martin J., 1987. Mortality due to respiratory cancers in the coke oven plants of the Lorraine coalmining industry (Houillères du Bassin de Lorraine). *British Journal of Industrial Medicine*, 44(8): 559-65.

Bessho T. K., Tano H., Kasai E. and Nishimura S., 1993. "Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells." *J Biol Chem*, 268(26): 19416-21.

Besarati Nia A. J., Kleinjans C. and Van Schooten F. J., 2002. Biomonitoring of tobacco smoke carcinogenicity by dosimetry of DNA adducts and genotyping and phenotyping of biotransformational enzymes: a review on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biomarkers*, 7(3): 209-29.

Bisson M., Diderich R., Dujardin R., Hulot C., Lacroix G., Lamy M.H., Lefevre J.P., Leveque S., Magaud H. and Tissot S., 2006. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques version. *Benzo(a)pyrène*, 2-3.

Bjelland S. and Seeberg E., 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531 (1-2):37-80.

Brandt H.C. and Watson W.P., 2003. "Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds." *Ann Occup Hyg*, 47(5): 349-78.

Bridges B. A., Sekiguchi M. and Tajiri T., 1996. "Effect of mutY and mutM/fpg-1 mutations on starvation-associated mutation in *Escherichia coli*: implications for the role of 7,8-dihydro-8-oxoguanine." *Mol Gen Genet*, 251(3): 352-7.

Briede J. J., Godschalk M. T., Emans T. M., De Kok E., Van Agen J., Van Maanen, F. J. and Kleinjans J. C., 2004. "In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo(a)pyrene metabolism." *Free Radic Res*, 38(9): 995-1002.

Bröker L. E., Kruyt F. A. and Giaccone G., 2005. Cell death independent of caspases : a review. *Clin Cancer Res*, 11 (9): 3155-3162.

Boffetta P., Jourenkova N. and Gustavsson P., 1997. "Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." *Cancer Causes Control*, 8(3): 444-72.

Bonnard M., Brondeau M.T., Clavel T., Falcy M., Jargot D. and Schneider O., 2007. Benzo(a)pyrène. *INRS fiche toxicologique*, 144.

Bouchard M., Dodd C. and Viau C., 1994. "Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of monohydroxylated PAH metabolites in urine." *J Anal Toxicol*, 18(5): 261-4.

Bouchard M. and Viau C., 1995. "Benzo(a)pyrenediolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxy-benzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene." *Arch Toxicol*, 69(8): 540-6.

Bouchard M. and Viau C., 1996. "Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites." *Toxicol Appl Pharmacol*, 139(2): 301-9.

Bouchard M. and Viau C., 1997. "Urinary excretion of benzo(a)pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo(a)pyrene administration." *Can J Physiol Pharmacol*, 75(3): 185-92.

Buening M.K., Wislocki P.G., Levin W., Vagi H., Akagi H. and Conney A.H., 1978. Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+) 7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(11): 5358-61.

Burczynski M.E., Lin H.K. and Penning T.M., 1999. Isoform-specific Induction of Human Aldo-Keto Reductase by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Electrophiles, and Oxidative Stress: Implication for the Alternative Pathway of PAH Activation Catalyzed by Human Dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Res*, 59: 607-614.

Burczynski M.E. and Penning T.M., 2000. Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ortho-Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer Res*, 60: 908-915.

Burrows C.J. and Muller J.G., 1998. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chemical Reviews*, 98 (3): 1109-1152.

Busbee D.L., Norman J.O. and Ziprin R.L., 1990. Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B 1 and benzo(a)pyrene. *Archives of Toxicology*, 64(4): 285-90.

-C-

Cadet J., Berger M., Douki T. and Ravanat J.L., 1997. Oxidative damage to DNA: Formation, Measurement, and Biological Significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 131:1-87.

Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L. and Sauvaigo S., 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424 (1-2): 9-21.

Cadet J., Douki T., Gasparutto D. and Ravanat J.L., 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531 (1): 5-23.

Cajaraville M.P., Hauser L., Carvalho G., Hylland K., Olabarrieta L., Lawrence A. J., Lowe D. and Goksoyr A., 2003. Genetic damage and the molecular/cellular response to pollution. Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses (eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L). *Blackwell Sciences*, 14-82.

Caino M.C., Oliva H., Jiang T., Penning M. and Kazanietz M.G., 2006. "Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol promotes checkpoint activation and G2/M arrest in human bronchoalveolar carcinoma H358 cells." *Mol Pharmacol*, 71(3): 744-750.

Garcia Martinez P., Winston G.W., Metash-Dickey C., O'Hara S.C. and Livingstone D.R., 1995. Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the corn mon mussel *Mytilus edulis*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 131: 332-341.

Chang K. W. H., Lee H. J., Wang S. Y., Chen. and Lin P., 1999. "Differential response to benzo(a)pyrene in human lung adenocarcinoma cell lines: the absence of aryl hydrocarbon receptor activation." *Life Sci*, 65(13): 1339-49.

Chen L., Devanesan P.D., Higginbotham S., Ariese F., Jankowiak R., Small G.J., Rogan E.G. and Cavalieri E.L., 1996. "Expanded analysis of benzo(a)pyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: their significance in tumor initiation." *Chem Res Toxicol*, 9(5): 897-903.

Chen S., Nguyen N., Tamura K., Karin M. and Tukey R.H., 2003. The role of the Ah receptor and p38 in benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(21): 19526-33.

Cleaver J. E., 2005. "Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair." *Nat Rev Cancer*, 5(7): 564-73.

Cooke M. S., Evans R., Dove R., Rozalski D., Gackowski A., Siomek J. and Olinski R., 2005. "DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine." *Mutat Res*, 574(1-2): 58-66.

Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C. and Vasseur P., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. Dans Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F., Biomarqueurs en Ecotoxicologie. *Masson, Paris*, 149-163.

Costa R. M., Chigancas V., Galhardo Rda S., Carvalho H. and Menck C. F., 2003. "The eukaryotic nucleotide excision repair pathway" *Biochimie*, 85: 1083-99.

-D-

Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N., Kroemer G., 2000. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, 476(3) : 118-23.

DeMarini D. M., 2004. "Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review." *Mutat Res*, 567(2-3): 447-74.

Denissenko M.F., Pao A. and Tang M., 1996. "Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53." *Science*, 274(5286): 430-2.

Dipple A., 1994. "Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA." *IARC Sci Publ*, 125: 107-29.

DiGiulio R.T., Habig C. and Gallagher E.P., 1993. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology*, 26: 1-22.

Dnison M.S. and Nagy S.R., 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 43: 309-34.

-E-

EFSA 2008. Polycyclic Aromatic hydrocarbons in food-Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA journal*, 724: 1-114.

-F-

Fenech M., 2000. "The in vitro micronucleus technique." *Mutat Res*, 455(1-2): 81-95.

Friedberg E.C., 2001. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature Review. Cancer*, 1- 22.

-G-

Gackowski D. R., Rozalski K., Roszkowski A., Jawien M. and Olinski R., 2001. "8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human urine do not depend on diet." *Free Radic Res*, 35(6): 825-32.

Gamage N., Barnett A., Hempel N., Duggleby R.G., Windmill K.F. and Martin J.L., 2006. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci*, 90(1): 5-22.

Garcia Martinez P., Winston G.W., Metash-Dickey C., O'Hara S.C. and Livingstone D.R., 1995. Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the corn mon mussel *Mytilus edulis*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 131: 332-341.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. and Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. *Comment l'oxygène peut-il devenir toxique Actualité chimique*, 11(12): 91-96.

Gendre C., Lafontaine P., Delsaut M. and Simon P., 2004. "Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and excretion of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHB(a)P): assesment of an appropriate sampling time." *Polycyclic Aromatic Compounds*, 24: 433-439.

Glatt H., 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 129 (1-2): 141-170.

Godschalk R. W., Moonen P.A., Schilderman W. M., Broekmans J.C. and Van Schooten F.J., 2000. "Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons." *Carcinogenesis*, 21(1): 87-92.

Godschalk R.W., Feldker P. J., Borm E. F. and van Schooten F. J., 2002. "Body mass index modulates aromatic DNA adduct levels and their persistence in smokers." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(8): 790-3.

Godschalk R.W., Van Schooten F.J. and Bartsch H., 2003. "A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds." *J Biochem Mol Biol*, 36(1): 1-11.

Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A., 2001. Immunologie. *Dunod, Paris*, 31-35.

Gorria M., Tekpli X., Sergent O., Huc L., Gaboriau F., Rissel M., Dimanche-Boitrel M.T. and Lagadic-Gossmann D., 2006. Membrane uidity changes are associated with benzo(a)pyrene-induced apoptosis in f258 cells. *Ann NY Acad Sci*, P: 1-5.

Gündel J. and Angerer J., 2000. "High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 3-hydroxy benzo(a)anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers." *Journal of Chromatography B*, 738: 47-55.

Gyorffy E.L., Anna Z., Gyori J., Segesdi J., Minarovits I., Soltesz S., Kostic A. and Schoket B., 2004. "DNA adducts in tumour, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection by ³²P-postlabelling and immunoassay." *Carcinogenesis*, 25(7): 1201-9.

-H-

Hasspieler B., Douglas M., Hafner G. and Adeli K., 1996. Influence of DT diaphorase on quinone-mediated genotoxicity in human and fish cell lines. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 360 (1): 43-49.

Haufroid V. and Lison D., 2005. "Mercapturic acids revisited as biomarkers of exposure to reactive chemicals in occupational toxicology: a minireview." *Int Arch Occup Environ Health* 78(5): 343-54.

Hecht S. S., 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst*, 9(1): 1194-1210.

Heidelberger C. and Weiss S.M., 1951. The distribution of radioactivity in mice following administration of 3,4-benzpyrene-5-C¹⁴ and 1,2,5,6-dibenzanthracene-9,10-C¹⁴. *Cancer Res*, 11: 885-891.

Hoeijmakers J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411: 366-374.

Hollender J., Koch B. and Dott W., 2000. "Biomonitoring of environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by simultaneous measurement of urinary phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene hydroxides." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 739(1): 225-9.

Hollstein M. D., Sidransky B. and Harris C.C., 1991. "p53 mutations in human cancers." *Science*, 253(5015): 49-53.

Holme J.A., Gorria M., Arlt V.M., Ovrebo S., Solhaug A. and Tekpli X., 2007. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo(a)pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chem Biol Interact*, 167(1): 41-55.

Hsu G.W., Huang X., Luneva N.P., Geacintov N.E. and Beese L.S., 2005. Structure of a high fidelity DNA polymerase bound to a benzo(a)pyrene adduct that blocks replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(5): 3764-70.

Huc L., Gilot D., Gardyn C., Rissel M., Dimanche-Boitrel M., Guillouzo A., Fardel O. and Lagadic-Gossmann D., 2003. Apoptotic mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in liver epithelial cells : role of p53 and pHi changes. *Ann N Y Acad Sci*, 10(10): 167-70.

Huc L., Sparfel L., Rissel M., Dimanche-Boitrel M., Guillouzo A., Fardel O. and Lagadic-Gossmann D., 2004. Identification of Na⁺/H⁺ exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Faseb J*, 18 (2): 344-6.

Huc L., Rissel M., Solhaug A., Tekpli X., Gorria M., Torriglia A., Holme J. A., Dimanche-Boitrel M.T. and Lagadic-Gossmann D., 2006. Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo(a)pyrene-exposed hepatic F258 cells. *J Cell Physiol*, 208 (3): 527-537.

-I-

IARC 1983. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 57-61.

-J-

Jaing H., Gelhaus S. L., Mangal D., Harvey R. G., Blair I. A. and Penning T.M., 2007. Métabolism of Benzo(a)pyrene in Human Bronchoalveolar H358 cells Using Liquid chromatography-Mass Spectrometry. *Chem .Res. Toxicol*, 20(9): 1331-1341.

Jernstrom B., Vadi H. and Orrenius S., 1984. Formation of DNA-binding products from isolated benzo(a)pyrene metabolites in rat liver nuclei. *Chemical Biological Interactions*, 20(3): 311-21.

Jez J.M. and Penning T.M., 2001. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions*, 130(132): 499-525.

Jia X. W., Liu X. L., Shi A., Gao B. R., You M., Ye F., Shen H. and Du H. J., 2005. "[Inhibition of the pathway of benzo(a)pyrene-induced cell cycle changes by all-trans retinoic acid in lung fibroblast]." *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 23(5): 329-32.

Jiang H. D., Vudathala I., Blair A. and Penning T. M., 2006. "Competing Roles of Aldo Keto Reductase 1A1 and Cytochrome P4501B1 in Benzo(a)pyrene-7,8-diol Activation in Human Bronchoalveolar H358 Cells: Role of AKRs in P4501B1 Induction." *Chem Res Toxicol*, 19(1): 68-78.

Jaing H., Gelhaus S. L., Mangal D., Harvey R. G., Blair I. A. and Penning T.M., 2007. Métabolism of Benzo(a)pyrene in Human Bronchoalveolar H358 cells Using Liquid chromatography-Mass Spectrometry. *Chem .Res. Toxicol*, 20(9): 1331-1341.

Jiménez M., Aranda F. J., Teruel J. A. and Ortiz A., 2002. The chemical toxic benzo(a)pyrene perturbs the physical organization of phosphatidylcholine membranes. *Environ Toxicol Chem*, 21 (4): 787-793.

-K-

Kao J., Patterson F. K. and Hall J., 1985. Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo(a)pyrene and testosterone. *Toxicol Appl pharmacol*, 81(3): 502-16.

Kanaar R., Hoeijmakers J. H. and van Gent D. C., 1998. "Molecular mechanisms of DNA double strand break repair." *Trends Cell Biol*, 8(12): 483-9.

Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R., 1972. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implication in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.

Kim J., Stransbury K., Walker N., Trush M., Strickland P. and Sutter T., 1998. Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis*, 19(10): 1847-53.

Kim H.S., Kwack S.J. and Lee B.M., 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo(a)pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo(a)pyrene. *Chemico-Biological Interactions*, 127 (2): 139-150.

Kim J.Y., Chung J.Y., Park J.E., Lee S.G., Kim Y.J. and Cha M.S., 2007. Benzo(a)pyrene induces apoptosis in RL95-2 human endometrial cancer cells by cytochrome P450 1A1 activation. *Endocrinology*, 148 (10): 5112-22.

King C.D., Rios G.R., Green M.D. and Tephly T.R., 2000. UDP-glucuronosyltransferases. *Current drug metabolism*, 1(2): 143-61

Klemme J.C., Mukhtar H. and Elmets C.A., 1987. Induction of contact hypersensitivity to dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene in C3H/HeN mice. *Cancer Res*, 47(22): 6074-6078 .

Kramata P. B., Zajc J. M., Sayer D. M., Jerina C. and Wei C.G., 2003. "A single site-specific trans-opened 7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-deoxyguanosine adduct induces mutations at multiple sites in DNA." *J Biol Chem*, 278(17): 14940-8.

Kruszewski M., 2003. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidativestress. *Mutat Res*, 531 (2): 81-92.

-L-

Legraverend C., Harrison D.E., Ruscetti F.W. and Nebert D.W., 1983. Bone marrow toxicity induced by oral benzo(a)pyrene: protection resides at the level of the intestine and liver. *Toxicol Appl Pharmacol*, 70(3): 390-401.

Lehmann A. R., 2005. "Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells." *FEBS Lett*, 579(4): 873-6.

Livingstone D. R., Garcia Martinez P., Michel M., Ribera D. and Winston G. W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis*, and other molluscs. *Functional Ecology*, 4: 415-424.

Livingstone D. R., Lips F., Garcia Martinez P. and Pipe R. K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 112: 265-276.

Livingstone D. R., Lemaire P., Matthews A. A., Peters L., Bucke D. and Law R.1., 1993. Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Marine Pollution Bulletin*, 26 (11): 602-606.

Lin P., Chang H., Tsai W.T., Wu M.H., Liao Y.S., Chen J.T. and Su J.M., 2003. Overexpression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Lung Carcinomas. *Toxicol Pathol*, 31: 22-30.

Ling H., Sayer J.M., Plosky B.S., Vagi H., Boudsocq F., Woodgate R., Jerina D.M. and Yang W., 2004. Crystal structure of a benzo(a)pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase. *Proceeding of the National Academy of Sciences United States of America*, 101(8): 2265-9.

Liu A. L., Lu Z. Z., Wang W. H., Chen W. H., Lu J., Yuan P. H., Nan J. Y. and Wu T. C., 2006. "Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, lymphocytic micronuclei, and serum glutathione S-transferase in workers exposed to coke oven emissions." *Environ Health Perspect*, 114(5): 673-7.

Lopes P.A., Pinheiro T., Santos M.C., Mathias M., Collares-Pereira M. J. and Viegas-Crespo A. M., 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *The Science of the Total Environment*, 280: 153-63.

Luch A., 2005. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nature Review, Cancer*, 5(2): 113-25.

Marchand A., Barouki R. and Garlatti M., 2004. Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. *Molecular pharmacology*, 65(4): 1029-37.

-M-

Marie C., Maitre A., Douki T., Gateau M., Tarantini A. and Guiraud P., 2008. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo(a)pyrene DNA adducts. *J Appl Toxicol*, 28(5): 579-90.

Matullo G. M., Peluso S., Polidoro S., Guarrera A., Munnia V., Krogh G. and Palli D., 2003. "Combination of DNA repair gene single nucleotide polymorphisms and increased levels of DNA adducts in a population-based study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12(7): 674-7.

McCoull K.D., Rindgen D., Blair I.A. and Penning T.M., 1999. "Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts." *Chem Res Toxicol*, 12(3): 237-46.

Mc.Millan B.J. and Brodfield C.A., 2007. The Aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *PNAS*, 104: 1412-1417.

Miao W., Scrivens P.J. and Batist G., 2005. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem*, 280(21): 20340-8.

Miller K.P. and Ramos K.S., 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo(a)pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev*, 33(1): 1-3.

Mitchell C. E., 1982. Distribution and retention of benzo(A)pyrene in rats after in halation *Toxicol Lette*, 11(1): 35-42.

-N-

Nagalingam A., Seo K.Y. and Loechler E.L., 2005. Mutagenesis studies of the major Benzo(a)pyrene N2-dG adduct in a S'-TG versus a S'-DG sequence: removal of the methyl group causes a modest decrease in the [G->T/G->A] mutational ratio. *Mutagenesis*, 20(2): 105-10.

Narbonne J.F., Garrigues P., Ribera D., Raoux C., Mathieu A., Lemaire P. and Lafaurie M., 1991. Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterraneansea. *Comp Biochem Physiol C*, 100: 37-42.

Newman M.C., 1998. Molecular effects and Biomarkers, In *Fundamentals of Ecotoxicology*, Ann Arbor Press, Chelsea, USA, 95-98.

Ng K. M., chu I., Bronaugh R. L., Franklin C. A. and Somers D. A., 1992. Percutaneous absorption and metabolism of pyrene , benzo(a)pyrene , and di(2-ethylhexyl) phthalate : comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guineapig. *Toxicol Appl pharmacol*, 115(2): 216-23.

Nguyen T., Nioi P. and Pickett C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*, 284(20): 13291-5.

Nijhawan D., Honarpour N. and Wang X., 2000. Apoptosis in Neural Development and Disease. *Annu Rev Neurosci*, 23: 73-87.

Norbury C. J. and Zhivotovsky B., 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23 (16) : 2797-2808.

Nousiainen U., Torronen R. and Hanninen O., 1984. Differential induction of various carboxylesterases by certain polycyclic aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicology*, 32 (3): 243-251.

-O-

Old L.J., Benacerraf B. and Carswell E., 1963. Contact reactivity to carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Nature*, 198: 1215-1216.

Osborne M.R., Harvey R.G. and Brookes P., 1978. The reaction of trans-7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene with DNA involves attack at the N7-position of guanine moieties. *Chem Biol Interact*, 20(1): 123-30.

-p-

Park E.M., Shigenaga P., Degan T.S., Korn J.W., Kitzler C. M. and Ames B.N., 1992. "Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column." *Proc Natl Acad Sci US A*, 89(8): 3375-9.

Park J.H., Troxel A.B., Harvey R.G. and Penning T.M., 2006. "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species." *Chem Res Toxicol*, 19(5): 719-28.

Park J. H., Mangal D., Tacka K. A., Quinn A. M., Harvey R. G., Blair I. A. and Penning T.M., 2008. Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans dihydrodiol activation in human lung A 549 cells . *PNAS*, 105 : 6846-6851.

Pavanello S., Favretto D., Brugnone F., Mastrangelo G., Dal Pra G. and Clonfero E., 1999. HPLC/fluorescence determination of anti-BPDE-DNA adducts in mononuclear white blood cells from PAH-exposed humans. *Carcinogenesis*, 20: 431-435.

Pavanello S. P., Simioli S., Lupi P. and Clonfero E., 2002. "Exposure levels and cytochrome P450 1A2 activity, but not N-acetyltransferase, glutathione S-transferase (GST) M1 and T1, influence urinary mutagen excretion in smokers." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(10): 998-1003.

Pavanello S.A., Pulliero E., Siwinska D. and Clonfero E., 2005. "Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B(a)PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke ovenworkers." *Carcinogenesis*, 26(1): 169-75.

Pellerin-Massicotte 1., 1997. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Journal de Recherche Océanographique*, 22: 91-98.

Penning T.M., Burczynski M.E., Hung C.F., McCoull K.D., Palackal N.T. and Tsuruda L.S., 1998. Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones. *Chemical Research in Toxicology*, 12 (1): 1-18.

Perera F. P., 1997. "Environment and cancer: who are susceptible?". *Science*, 278(5340): 1068-73.

Perera F. P. and Weinstein I. B., 2000. "Molecular epidemiology: recent advances and future directions." *Carcinogenesis*, 21(3): 517-24.

Pfeifer G. P., and Hainaut P., 2003. "On the origin of G --> T transversions in lung cancer." *Mutat Res*, 526(1-2): 39-43.

Pocar P., Brevini T. A., Antonini S. and Gandolfi F., 2006. "Cellular and molecular mechanisms mediating the effect of polychlorinated biphenyls on oocyte in vitro maturation." *Reproductive Toxicology*, (2): 242-249.

-Q-

Qu S.X. and Stacey N.H., 1996. Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo(a)pyrene. *Carcinogenesis Jan*, 17(1): 53-9.

-R-

Ramakrishna N.V., Gao F., Padmavathi N. S., Cavalieri E. L., Rogan E. G., Cerny R. L. and Gross M. L., 1992. "Model adducts of benzo(a)pyrene and nucleosides formed from its radical cation and diol epoxide." *Chem Res Toxicol*, 5(2): 293-302.

Randerath K. P., Sriram B., Moorthy J. P., Aston R. A., Baan P. T., van den Berg E. D. and Watson W.P., 1998. "Comparison of immunoaffinity chromatography enrichment and nuclease P1 procedures for 32P-postlabelling analysis of PAH-DNA adducts." *Chem Biol Interact*, 110(1): 85-102.

Rechkoblit O. Y., Zhang D., Guo Z., Wang S., Amin J., Krzeminsky N. and Geacintov N. E., 2002. "trans-Lesion synthesis past bulky benzo(a)pyrene diol epoxide N2-dG and N6-dA lesions catalyzed by DNA bypass polymerases." *J Biol Chem*, 277(34): 30488- 94.

Robinson J.R., Felton J.S., Levitt R.C., Thorgeirsson S.S. and Nebert D.W., 1975. Relationship between aromatic hydrocarbon responsiveness and the survival times in mice treated with various drugs and environmental compounds. *Mol Pharmacol*, 11(6): 850-865.

Rogan E.G., RamaKrishna S., Higginbotham E. L., Cavalieri H., Jeong R. and Small G. J., 1990. "Identification and quantitation of 7-(benzo[a]pyren-6-yl)guanine in the urine and feces of rats treated with benzo(a)pyrene." *Chem Res Toxicol*, 3(5): 441-4.

Rojas M. B., Marie J.M., Vignaud N., Martinet J., Siat G., Grosdidier I. and Alexandrov K., 2004. "High DNA damage by benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma." *Cancer Lett*, 207(2): 157-63.

Rosenquist T.A., Zharkov D. and Grollman A. P., 1997. "Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase." *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(14): 7429-34.

Ribera D., Narbonne J. F., Michel X., Livingstone D. R. and O'Hara S., 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussel to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol*, 100: 177-181.

Ruan Q., Gelhaus S.L., Penning T. M., Harvey R. G. and Blair I. A., 2007. "Aldo-Keto Reductase- and Cytochrome P450-Dependent Formation of Benzo(a)pyrene-Derived DNA Adducts in Human Bronchoalveolar Cells." *Chem Res Toxicol*, 20(3): 424-31.

-S-

Sagher D. and Strauss B., 1983. "Insertion of nucleotides opposite apurinic/aprimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis: uniqueness of adenine nucleotides." *Biochemistry*, 22(19): 4518-26.

Sayer J., Chadha A., Agarwal S., Yeh H., Yagi H. and Jerina D., 1991. Covalent nucleoside adducts of benzo(a)pyrene 7,8-diol 9,10-epoxides: structural reinvestigation and characterization of a novel adenosine adduct on the ribose moiety. *J Org Chem*, 56 (1): 20-9.

Sehgal A., Kuman M. and Jain M., 2011. Piperine as an adjuvant increases the efficacy of curcumin in mitigating benzo(a)pyrene toxicity. *Hum Exp Toxicol*, 25.

Sheehan D., Meade G., Foley V.M. and Dowd C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* Nov, 15(1): 1-16.

Shen Y. M., Troxel S., Vedantam T.M., Penning A. and Field J., 2006. "Comparison of p53 Mutations Induced by PAH o-Quinones with Those Caused by anti-Benzo(a)pyrene Diol Epoxide in Vitro: Role of Reactive Oxygen and Biological Selection." *Chem Res Toxicol*, 19(11): 1441-1450.

Shi Q. L., Wang M. L., Bondy A., Brewster S. E., Singletary E. and Wei Q., 2004. "Reduced DNA repair of benzo(a)pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients." *Carcinogenesis*, 25(9): 1695-700.

Shimada T., 2006. Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21 (4): 257-276.

Simonelli V., Narciso L., Dogliotti E. and Fortini P., 2005. Base excision repair intermediates are mutagenic in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 4404- 33.

Simon P.M., Lafontaine P., Delsaut Y. and Nicot T., 2000. "Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 748(2): 337-48.

Smithgall T.E., Harvey R.G. and Penning T.M., 1988. Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by

dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *J Biol Chem*, 263(4): 1814-20.

Solhaug A., Ovrebo S., Mollerup S., Lag M., Schwarze P.E. and Nesnow S., 2005. Role of cell signaling in B(a)P-induced apoptosis: characterization of unspecific effects of cell signaling inhibitors and apoptotic effects of B(a)p metabolites. *Chem Biol Interact Jan*, 151(2): 101-19.

-T-

Takaishi M., Suzuki J. S., Satoh M. and Nagase H., 2009. The protective role of metallothionein in benzo(a)pyrene induced DNA damage. *J. Toxicol. Sci*, 34: 449-458.

Tarantini A., Maitre A., Lefebvre E., Marques M., Marie C., Ravanat J. L. and Douki T., 2009. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo(a)pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 671 (1): 67-75.

Thyssen J., Althoff J., Kimmerle G. and Mohr U., 1981. Inhalation studies with benzo(a)pyrene in Syrian golden hamsters. *Journal of the National Cancer Institute*, 66(3): 575-7.

Turner A. and Rawling M.C., 2002. Sorption of benzo(a)pyrene to sediment contaminated by acid mine drainage: contrasting particle concentration-dependencies in river water and seawater. *Water Research*, 36 (8): 2011-2019.

-V-

Valko M., Rhodes C.J., Monocola J., Izakovic M. and Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*, 160: 1-40.

Van Damme K. and Casteleyn L., 2003. "Current scientific, ethical and social issues of biomonitoring in the European Union." *Toxicol Lett*, 144(1): 117-26.

Van Rooij J., Bodelier Bode M. and Jiongeneelen F., 1993. «Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers». *Br. J. Ind. Med*, 50: 623-632.

Veglia F.G. and Vineis P., 2003. "Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12(2): 157-60.

Venugopal R. and Jaiswal A.K., 1998. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene*, 17(24): 3145-56.

Verly W. G. and Paquette Y., 1972. "An endonuclease for depurinated DNA in *Escherichia coli* B" *Can J Biochem*, 50: 217-24.

Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M. N. and Orunes M., 1990. Heavy metals effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 97: 37-42.

-W-

Wallace S.S., 1994. "DNA damages processed by base excision repair: biological consequences." *Int J Radiat Biol*, 66(5): 579-89.

Wang J. J., Marshall D., Frazer G., Law B. and Lewis D. M., 2003. "Characterization of DNA adducts from lung tissue of asphalt fume-exposed mice by nanoflow liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Anal Biochem*, 322(1): 79-88.

Wester R.C., Maibach H. I., Bucks D. A., Sedik L., Melendres J., Liao C. and Dizio S., 1990. Percutaneous absorption of [¹⁴C] DDT and [¹⁴C] benzo(a)pyrene from soil. *Fundam Appl Toxicol*, 15(3): 510-6.

Weimann A. D. and Poulsen H. E., 2002. "Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *Nucleic Acids Res*, 30.

Weimann A. B., Riis. and Poulsen H. E., 2004. "Oligonucleotides in human urine do not contain 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine." *Free Radic Biol Med*, 36(11): 1378-82.

Wong J.M. and Harper P. A., 2001. "Human aryl hydrocarbon receptor polymorphisms that result in loss of CYP1A1 induction." *Biochem Biophys Res Commun*, 288(4): 990-6.

Wolff R.K., Griffith W.C., Henderson R.F., Hahn F.F., Harkema J.R., Rebar A.H., Eidson A.F. and McClellan R.O., 1989. Effects of repeated inhalation exposures to 1-nitropyrene, benzo[a]pyrene, Ga₂O₃ particles, and SO₂ alone and in combinations on particle clearance, bronchoalveolar lavage fluid composition, and histopathology. *J Toxicol Environ Health*, 27(1): 123-138.

Wolfe A.R., Smith T.J. and Meehan T., 2004. Benzo(a)pyrene diol epoxide forms covalent adducts with deoxycytidylic acid by alkylation at both exocyclic amino N(4) and ring imino N-3 positions. *Chem Res Toxicol*, 17(4): 476-91.

Winston G. W. and DiGiulio R. T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19: 137-191.

-X-

Xie Z. E., Braithwaite D., Guo B., Zhao N. E. and Wang Z., 2003. "Mutagenesis of benzo(a)pyrene diol epoxide in yeast: requirement for DNA polymerase zeta and involvement of DNA polymerase eta." *Biochemistry*, 42(38): 11253-62.

Xue B., Lei Z.M., Zhao X.L. and Yang X.H., 1991. Acute immunotoxicity induced by benzo(a)pyrene in mice. *Zhongguo Yao Xue Za Zhi*, 5: 221-222.

Xue W. and Warshawsky D., 2005. "Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review." *Toxicol Appl Pharmacol*, 206(1): 73-93.

Xiong P. M., Bondy D., Li H., Shen L. E., Wang S. E., Singletary M. R. and Wei Q., 2001. "Sensitivity to benzo(a)pyrene diol-epoxide associated with risk of breast cancer in young women and modulation by glutathione S-transferase polymorphisms: a case-control study." *Cancer Res*, 61(23): 8465-9.

-Y-

Yang S.K., 1988. Stereo selectivity of cytochrome P450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Pharmacol*, 37: 61- 70.

Yang Y., Griffiths T., Midtvedt J., Sjovall J., Rafter W. J. and Gustafsson J. A., 1999. "Characterization of conjugated metabolites of benzo(a)pyrene in germ-free rat urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry." *Chem Res Toxicol*, 12(12): 1182-9.

Yoshikawa M., Arashidani K. and Kodama Y., 1990. "Analysis of 3-hydroxybenzo(a)pyrene by high-performance liquid chromatography using a post-column method." *J Chromatogr*, 532(1): 155-61.

-Z-

Zhang Y. X., Guo O., Rechkoblit N. E., Geacintov Wu D. and Wang. Z., 2002. "Two-step error-prone bypass of the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG adducts by human DNA polymerases eta and kappa." *Mutat Res*, 510(2): 23-35.

الحمد لله الذي جعلنا من عباده المخلصين

Cibles biochimiques et biomarqueurs d'exposition au benzo(a)pyrène

RESUME

Le benzo(a)pyrène (B(a)p) est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), il est le premier à avoir été reconnu pour présenter une activité cancérogène et à être impliqué dans le cancer du poumon chez l'homme. Il est formé à partir de la combustion de différents produits est présent à de fortes concentrations dans notre environnement quotidien. Le métabolisme du B(a)p s'effectue selon des réactions de bioactivation ou (de phase I) et des réactions de phase II. Le B(a)p est un inducteur des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Certains de ses métabolites peuvent se lier de façon covalente à l'ADN et former des adduits provoquant des mutations qui, en cas de non réparation conduisent au cancer. Ces métabolites peuvent quant à eux générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) responsables de dommages oxydatifs aux protéines, aux lipides et à l'ADN. Le B(a)p est également un inducteur puissant de l'apoptose. La surveillance biologique de l'exposition aux B(a)p apparaît ainsi comme un outil essentiel à la prévention, et celle-ci est permise par l'étude de tout un panel de biomarqueurs pouvant être détectés bien avant la survenue d'un cancer.

Mots clés : benzo(a)pyrène, mutation, stress oxydant, apoptose, biomarqueurs.

SUMMARY

Benzo(a)pyrene B(a)p is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), It is the first to be recognized as presenting a carcinogenic activity and to be involved in humans lung cancer. It is formed from different products combustion and present in high concentrations in our everyday environment. B(a)p metabolism is carried out according bioactivation reactions or (phase I) and reactions the phase II. B(a)p is an inducer of xenobiotic metabolizing enzymes. Some of its metabolites may bind covalently to DNA and form adducts causing mutations in case of repair lead to cancer. These metabolites can generate reactive oxygen species (ROS) that causes oxidative damages to proteins, lipids and DNA. B(a)p is also a potent inducer of apoptosis. Biological monitoring of exposure to B(a)p thus appears as an essential tool in the prevention, and it is permitted by the study of a whole range of biomarkers that can be detected before cancer onset.

Keywords: benzo(a)pyrene, mutations, oxidative stress, apoptosis, biomarkers.

ملخص

البنزو(أ)بيرين هو هيدروكربون عطري متعددة الحلقات . ويعتبر المسؤول الأول عن سرطان الرئة عند الإنسان. يتشكل من احتراق مواد مختلفة و يتواجد بتركيز عالية في محيطنا اليومي. أيض البنزو(أ)بيرين يتم من خلال تفاعلات التنشيط (تفاعلات المرحلة الأولى) وكذا تفاعلات المرحلة الثانية للأيض الخلوي . البنزو(أ)بيرين هو محفز لإنزيمات الأيض الخلوي للأجسام الغريبة. بعض من نواتج أيض البنزو(أ)بيرين له القدرة على الارتباط مع الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين بروابط تكافئية مسببا طفرات مسؤولة عن سرطانات متعددة في حالة عدم ترميمها. هذه المركبات يمكن أن تتدخل في تشكيل الجذور الحرة الأكسجينية التي تسبب أضرارا تأكسدية للبروتينات والدهون و الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين . البنزو(أ)بيرين يعتبر أيضا محفزا قويا للموت الخلوي المبرمج. تعتبر المراقبة البيولوجية للتعرض للبنزو(أ)بيرين وسيلة أساسية للوقاية من خلال قياس مجموعة من المؤشرات الحيوية التي يمكن الكشف عنها قبل ظهور السرطان.

الكلمات المفتاح: البنزو(أ)بيرين, الطفرات, الأضرار التأكسدية, موت الخلايا المبرمج, المؤشرات الحيوية.